

**Aus dem Institut für Pharmakologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Herr Prof. Dr. R. Grosse**



Die DAG/OAG-Sensitivität des TRPC5 in HEK293- und HT22-Zellen

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Maximilian Philipp aus Frankfurt a.M.
Marburg, 2016**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
30.05.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. T. Plant

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. N. Decher

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	11
SUMMARY	12
1. EINLEITUNG	15
1.1. Die „transient-receptor-potential“-Superfamilie	16
1.2. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der TRP-Kanäle	19
1.3. Die Subfamilie der TRPC-Kanäle	20
1.4. TRPC-Kanäle im Zentralen Nervensystem (ZNS)	21
1.5. Aktivierungsmechanismen für TRPC-Kanäle	23
1.5.1. TRPC-Aktivierung durch G _q -gekoppelte Rezeptoren & RTK	23
1.5.2. TRPC-Aktivierung durch Entleerung intrazellulärer Ca ²⁺ -Speicher	27
1.5.3. Einbau der TRPCs in die Zellmembran	28
1.5.4. Zusammenfassung der Aktivierungsmöglichkeiten für TRPCs	29
1.6. Inaktivierung der TRPC-Kanäle durch die PKC	30
1.7. DAG-Sensitivität von TRPC4 und TRPC5	34
1.8. Zielsetzung dieser Arbeit	36

2. MATERIAL UND METHODEN	38
2.1. Verwendete Materialien, Geräte und Softwareprogramme	38
2.2. Zellkultur und Transfektionen	38
2.2.1. Zellkultur	38
2.2.2. Transfektionen	39
2.2.3. Vereinzeln der Zellen am Versuchstag	40
2.3. Elektrophysiologie	41
2.3.1. Die Patch-Clamp-Technik	41
2.3.2. Praktische Durchführung einer Patch-Clamp Messung	43
2.3.3. Aufbau des Patch-Clamp-Verstärkers	47
2.3.4. Details zu Einstellungen während der Messungen	50
2.3.5. Auswertung der Patch-Clamp-Messungen	53
2.3.6. Zusammensetzung der verwendeten Bad- und Pipetten-Lösungen	54
2.4. Molekularbiologie	55
2.4.1. Verwendete Kanal-, Rezeptor- und Fluoreszenzprotein-Plasmide	55
2.4.2. Amplifikation der Plasmide	56
2.4.3. Grundlagen zu RNA interference (RNAi)	58
2.4.4. siRNA-Sequenzen	60
2.4.5. Design der siRNA Sequenzen	60
2.4.6. Einbau der siRNA Oligos in den Vektor pSuper.neo.GFP	61
2.4.7. PepTag [®] Assay: nicht-radioaktive Messung der Aktivität der PKC	63
3. ERGEBNISSE	66

3.1. DAG-Sensitivität des TRPC5	66
3.2. OAG-Sensitivität der TRPC5-Mutanten	69
3.3. Testung verschiedener Agonisten an HT22-Zellen	74
3.3.1. Einsatz von Chlorid-Kanal-Blockern	74
3.3.2. Eigenschaften des Ionenstroms unter Chlorid-Kanal-Blockade	75
3.3.3. Einsatz von GTPγS, OAG und DHPG in HT22-Zellen	76
3.4. Einsatz von siRNAs gegen TRPCs in HT22-Zellen	80
3.4.1. siRNAs gegen TRPC1, 3, 4, 6 und 7 in HT22-Zellen	80
3.5. Einsatz einer siRNA gegen TRPC5 in HEK-293- & HT22-Zellen	85
3.5.1. Testung der siRNA gegen TRPC5 in HEK293-Zellen	85
3.5.2. Einsatz der siRNA gegen TRPC5 in HT22-Zellen	92
4. DISKUSSION	95
4.1. DAG/OAG-Sensitivität des TRPC5	95
4.1.1. OAG-Sensitivität der Mutanten TRPC5-T972A, -T752A & -S666A	95
4.1.2. DAG/OAG-Sensitivität des TRPC5 in Abhängigkeit von der PKC	96
4.1.3. Einfluss der Proteinkinase C auf TRPC-Kanäle	97
4.1.4. Resultierende Experimente aus diesen Ergebnissen	99
4.1.5. Schlussfolgerungen mit Blick auf vorangegangene Erkenntnisse	101
4.1.6. Ausblick	105
4.2. Charakterisierung der HT22-Zellen	106
4.2.1. Elektrophysiologische Untersuchungen an HT22-Zellen	106

4.2.2.	TRPC5: ein Kandidat für den Kationenstrom in HT22-Zellen	107
4.2.3.	Testung von aTRPC5 in HEK-293-Zellen mit TRPC3, 5 und 6	109
4.2.4.	Bewertung der Ergebnisse und Ausblick	112
5.	ANHANG	114
5.1.	Heteromerbildung zwischen TRPC-Kanälen	114
5.2.	Tabelle mit Aktivatoren und Inhibitoren der TRPC-Kanäle	115
5.3.	Verwendete Materialien und Geräte	116
5.3.1.	Verbrauchsmaterialien	116
5.3.2.	Chemikalien	116
5.3.3.	Enzyme und Kits	118
5.3.4.	Allgemeine Laborgeräte	119
5.3.5.	Allgemeine Software-Programme	120
5.3.6.	Bestandteile des Patch-Clamp-Standes und Bedienungssoftware	120
5.4.	Bestimmung der PKC-Aktivität	122
5.5.	Ausreißer-Test nach Grubbs	126
	QUELLENVERZEICHNIS	128
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	141
	Gutenberg-Universität Mainz (vorklinischer Teil des Studiums)	141

Philipps-Universität Marburg (klinischer Teil des Studiums)**141****DANKSAGUNG****142**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
AlF	Aluminiumfluorid
Aminosäuren:	
A	Alanin
S	Serin
T	Threonin
Y	Tyrosin
ATP	Adenosintriphosphat
BIM-I	Bisindolylmaleimid, Inhibitor der PKC
Ca^{2+}	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]$	Intrazelluläre Calcium-Konzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cl^-	Chlorid
DAG	Diacylglycerin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DHPG	[RS]-3,5-Dihydroxyphenylglycin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärkt grün-fluoreszierende Protein
EGF	<i>epithelial growth factor</i> , epithelialer Wachstumsfaktor
EGTA	<i>Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure</i>

EMEM	minimal essential medium (MEM) with Earl's salts
ER	endoplasmatisches Retikulum
Gd3+	Gadolinium
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
GPCR	G-Protein coupled receptor, G-Protein-koppelnde Rezeptoren
GTPyS	Guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphat
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IV	Strom-Spannungsbeziehung
K ⁺	Kalium
La ³⁺	Lanthan
LPC	Lysophosphatidylcholin
MAG	Monoacylglycerol
Mg ²⁺	Magnesium
MLCK	<i>myosin-light-chain-kinase</i> , Myosin-Leichtketten-Kinase
Na ⁺	Natrium
NHERF	<i>Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OAG	1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol
PCR	polymerase-chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP5K	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorboldiester phorbol 12-myristate 13-acetate
P-Wert	Signifikanzwert
rM ₅ R	muskarinischer M ₅ -Rezeptor der Ratte
ROCE	<i>receptor-operated-calcium-entry</i> , Rezeptor induzierter Ca ²⁺ -Einstrom
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic acid</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SOCE	<i>store-operated-calcium-entry</i> , speicherinduzierter Ca ²⁺ -Einstrom
Src	<i>tyrosinkinase sarcoma</i>
STIM 1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
TRP-Kanäle	<i>transient-receptor-potential</i> Ionenkanäle
TRPC	<i>TRP-canonical</i>
aTRPC5	siRNA gegen TRPC5
ZNS	Zentrales Nervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

Die Familie der „*transient receptor potential*“ (TRP) Ionenkanäle wurde zuerst in der *Drosophila melanogaster* entdeckt. Die Mitglieder der Subgruppe von TRP-Kanälen, deren Aminosäuresequenz der des *Drosophila*-TRP am meisten ähneln, werden TRP *canonical* (TRPC) genannt. Alle Mitglieder dieser Familie sind nichtselektive Kationenkanäle und gelten als aktivierbar durch G_q - und G_i -koppelnde Rezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen. Durch eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) gespalten. TRPC2, 3, 6 und 7 können durch DAG und sein Analogon OAG (1-Oleyl-2-acetyl-sn-glycerol) aktiviert werden. Die eng miteinander verwandten TRPC4 und 5 jedoch nicht.

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass TRPC4 und 5 in HEK293- und CHO-K1-Zellen sensibel für DAG und OAG werden, wenn die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) gehemmt wird oder ein G_q - oder G_i -koppelnder Rezeptor für drei Tage zusammen mit dem Kanal koexprimiert war. In dieser Arbeit werden Daten vorgelegt, die diese Beobachtungen weiter stützen.

In Patch-Clamp-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der TRPC5 ebenfalls für OAG sensibel wird, wenn die wahrscheinliche Phosphorylierungsstelle der PKC (Threonin an Position 972) mutiert ist. In der murinen HT22-Zelllinie, welche aus dem Hippocampus, einer Region mit einer hohen Expression des TRPC5, stammt, konnte ein Ionenstrom elektrophysiologisch untersucht werden. Dieser war mit GTPyS (Guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate) und über Glutamat-Rezeptoren mittels DHPG ([RS]-3,5-Dihydroxyphenylglycin) aktivierbar. Die Strom-Spannungsbeziehung wies einige Ähnlichkeiten zu der des TRPC5 auf. Zudem

konnte eine siRNA, die gegen den TRPC5 gerichtet war, den Strom unterdrücken. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass in HT22-Zellen ein endogener TRPC5-Strom untersucht werden kann. Der TRPC5 in HT22-Zellen war ebenfalls erst dann für OAG sensibel, wenn zuvor die Aktivität der Proteinkinase C gehemmt worden war.

Gestützt auf diese Ergebnisse erfolgten weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Es bestätigte sich, dass NHREF, welches über die VTTLR Region an TRPC4 und 5 bindet, einen inhibitorischen Einfluss auf die Kanäle hat. Die Mutation des Threonins an Position 972 des TRPC5 (neues Bindungsmotiv: VATLR) verhindert diese Bindung durch einen Verlust der Phosphorylierung durch die PKC. Für PIP_2 konnte ebenfalls der inhibitorische Einfluss auf TRPC4 und 5 bestätigt werden. Es zeigte sich, dass dem Abbau von PIP_2 ein Aufbrechen der Bindung zwischen NHERF und Kanal folgt. Eine Wegnahme der Inhibition durch PIP_2 und NHERF führte zu einer DAG/OAG-Sensitivität der Kanäle.

In der Zusammenschau führen die Ergebnisse zu einem neuen Modell der Rezeptoraktivierbarkeit für TRPC4 und 5. Die Rezeptoraktivierung führt über das G-Protein zu einer Aktivierung der PLC und damit zu einem Abbau des inhibitorischen PIP_2 . Nachfolgend wird auf einem noch unbekannten Weg die Bindung der Kanäle zu NHERF aufgebrochen und es erfolgt die Aktivierung der Kanäle mittels des PIP_2 -Spaltprodukts DAG.

SUMMARY

The family of transient receptor potential (TRP) ion channels was first described in *Drosophila melanogaster*. The subgroup of TRP-channels whose amino-acid sequences are most closely related to *Drosophila*-TRP is called TRP canonical

(TRPC). All members of this family are non-selective, receptor-operated cation channels activated by G-protein coupled receptors that couple to G_q or G_i , or by receptor tyrosine kinases (RTKs). Activation of the G-protein or the RTK leads to PLC-mediated cleavage of PIP_2 to DAG and IP_3 . TRPC2, 3, 6 and 7 are directly stimulated by DAG, while TRPC4 and 5 are not.

Data collected by our research group show that TRPC4 and 5 become sensitive to DAG/OAG if the activity of PKC is downregulated or if the channels are co-transfected with G_q - or G_i -coupling receptors for three days. Data shown in this dissertation provide further evidence for these observations.

Murine TRPC5 becomes sensitive to OAG when the proposed phosphorylation site of the PKC (threonine at position 972) is mutated to alanine. Murine HT22-cells derived from the hippocampus, a region of the CNS known for its high expression levels for TRPC5, show a cation current with similarities in its I-V to heterologously expressed TRPC5. The current can be activated by GTPyS and DHPG (via glutamate receptors) and is inhibited by an siRNA directed against TRPC5. These results suggest that TRPC5 is expressed endogenously in HT22 cells. Furthermore, the endogenous current can be activated by OAG following inhibition of PKC.

Based on these findings, our research group made further investigations. NHERF, which is known to bind TRPC4 and 5 at the VTTLR region, has an inhibitory effect on these channels. Mutation of threonine at position 972 of TRPC5 (new binding motif: VATLR) prevents the phosphorylation by PKC resulting in a loss of coupling to NHERF. In the case of PIP_2 , the inhibitory effect on TRPC4/5 could also be confirmed. It was shown that degradation of PIP_2 leads to a dissociation of NHERF from the channel protein. The loss of inhibitory effects of NHERF and PIP_2 results in DAG/OAG-sensitivity of TRPC4 and 5.

In summary, these findings lead to a new model for receptor activation of these channels. Binding of an agonist to its receptor leads to G-Protein mediated activation of PLC and degradation of PIP_2 . The latter, by an as yet unknown pathway, causes dissociation of NHERF from the channel protein so that the PIP_2 product DAG is able to activate TRPC4 and 5.

1. EINLEITUNG

Eine Zelle wird von ihrer Plasmamembran begrenzt. Diese aus einer doppelten Lage Phospholipidmolekülen aufgebaute Trennschicht bildet eine Barriere für geladene Teilchen, die im wässrigen Milieu des Intra- und Extrazellulärtraumes gelöst sind. In diese hydrophobe Membran sind verschiedene Proteine eingelagert, die eine Vielzahl von Funktionen übernehmen. Rezeptoren nehmen Signale durch das Binden von extrazellulären Botenstoffen wahr und beeinflussen dann unterschiedliche Signalkaskaden im Zellinneren. Über Ionenkanäle, die man sich vereinfacht als hydrophile Poren vorstellen kann, können geladene Teilchen wie Kationen (v.a. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) und Anionen (v.a. Cl^-) die Zellmembran passieren, wodurch sich das elektrische Potential über die Membran verändert. Das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle kann durch die bereits genannten extrazellulären Rezeptoren, aber auch vom Zellinneren her beeinflusst werden. Kinasen können z.B. durch das Anhängen einer Phosphat-Gruppe die Aktivität von Ionenkanälen beeinflussen.

Eine besondere Rolle unter den Kationen nimmt das Calcium (Ca^{2+}) ein. Seinem elektrochemischen Gradienten folgend kann es von außen in die Zelle einströmen oder aus intrazellulären Speichern freigegeben werden, um im Zellinneren an Signalen für sehr unterschiedliche Zellfunktionen (z.B. Muskelkontraktion, Hormon- und Neurotransmittersekretion, Zellwachstum oder Zelltod) beteiligt zu sein.

Für ausführlichere Erklärungen zu diesen Grundlagen wird auf die gängigen Lehrbücher verwiesen (Schmidt, Lang, and Heckmann 2010, Alberts, Bray, and Hopkin 2012).

1.1. Die „transient-receptor-potential“-Superfamilie

Die Wurzeln der „*transient-receptor-potential*“ (TRP) Ionenkanäle liegen in der Forschung über die Phototransduktion der „schwarzbäuchigen“ Taufliege – der *Drosophila melanogaster*. Cosens und Manning (1969) fanden eine Mutante der *Drosophila*, die im Retinogramm auf einen lang einwirkenden Lichtreiz mit einer kurzen (transienten), anstelle der üblichen anhaltenden Antwort, reagierte. Erst einige Jahre später konnten Montell und Rubin (1989) das fehlende Protein dieser *Drosophila*-Mutante identifizieren. Hardie und Minke (1992) wiederum konnten durch

Patch-Clamp-Messungen nachweisen, dass es sich bei diesem Protein um einen für Ca^{2+} permeablen Ionenkanal handelte, ohne den sich die Depolarisation der Rezeptorzelle nicht aufrecht erhalten lässt - den *Drosophila*-TRP (dTRP).

Die Genome verschiedenster Spezies wurden daraufhin mit Hilfe der dTRP-Sequenz auf Verwandte DNA-Abschnitte untersucht. In den folgenden Jahrzehnten fanden sich u.a. in Hefen, Fliegen, Würmern, Fischen, Mäusen und beim Menschen insgesamt über 100 verschiedene TRP-ähnliche Proteine. Bis heute sind beim Menschen 27 TRP-Ionenkanäle bekannt, die aufgrund von Ähnlichkeiten ihrer Aminosäuresequenzen in sechs TRP-Subfamilien eingeordnet werden: Die Untergruppe, deren Sequenz am wenigsten von der des *Drosophila*-TRPs abweicht, wird als klassischer TRP oder „TRP-*canonical*“ (TRPC) bezeichnet. Des Weiteren gibt es die TRPs vom Vanilloid-Rezeptor-Typ (TRPV), dem Melastatin-Typ (TRPMs), dem Mukolipin-Typ (TRPML), dem Polycystin-Typ (TRPP) und dem Ankyrin-Transmembran-Protein-1-Typ (TRPA1) (Montell et al. 2002, Clapham et al. 2005).

Für den Aufbau der TRP-Proteine hatte man aufgrund ihrer Primärstruktur und verschiedener Indizien schon lange ein Modell entworfen (Vannier et al. 1998), welches durch Liao et al. (2013) schließlich mittels 3D-Elektronen-Kryomikroskopie im Falle des TRPV1 bestätigt werden konnte. TRP-Kanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), einem intrazellulären N- und C-Terminus und einer Region zwischen S5 und S6, die am Aufbau der für Kationen durchlässigen Kanalpore beteiligt ist. Vier solcher Proteinuntereinheiten lagern sich schließlich zu einem Kanal zusammen (Abb. 1.1). Dieses Tetramer kann aus viermal demselben TRP-Protein als Homomer, oder aus verschiedenen TRP-Proteinen als Heteromer aufgebaut werden (Kedei et al. 2001, Hofmann et al. 2002). Dabei scheint es keine beliebigen Kombinationsmöglichkeiten zwischen den einzelnen TRP-Proteinen zu geben. Welche Heteromere bisher für die TRPC-Subfamilie in der Literatur beschrieben sind, wird im Anhang (vgl. Kapitel 5.1) exemplarisch zusammengefasst. Die Eigenschaften der Homo- und Heteromere können dabei sehr unterschiedlich sein, was eine Vervielfältigung der Funktionsmöglichkeiten der verschiedenen TRP-Proteine mit sich bringt. Zum Beispiel unterscheidet sich das TRPC5-Homomer vom TRPC5/TRPC1-Heteromer in der Strom-Spannungs-Beziehung und der Einzelkanalleitfähigkeit (Strübing et al. 2001). Außerdem ist die Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen in beiden Ionenkanälen unterschiedlich (Storch et al. 2012).

Für eine ausführlichere Übersicht über den Aufbau der TRP-Kanäle im Allgemeinen wird auch auf die verschiedenen publizierten Reviews verwiesen (Flockerzi 2007, Venkatachalam and Montell 2007, Nilius and Owsianik 2011, Flockerzi and Nilius 2014).

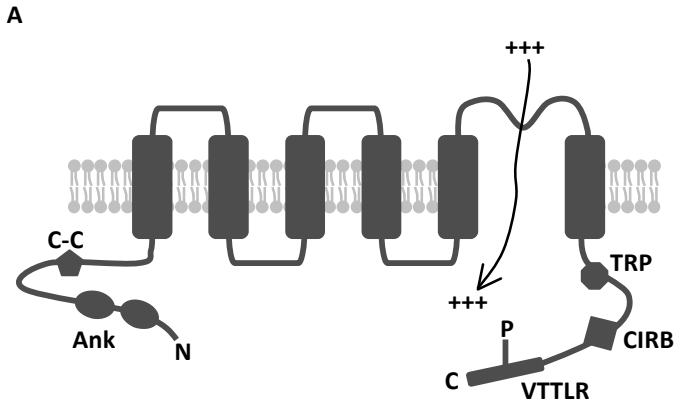


Abbildung 1.1 Aufbau der TRP-Kanäle

A: Die TRP-Kanäle verfügen über sechs Transmembrandomänen (wobei vermutlich die Transmembransegmente 5 und 6 an der Bildung der eigentlichen Pore für Kationen beteiligt sind) und einen intrazellulären N- und C-Terminus. Die TRP-Kanäle ähneln sich unterschiedlich stark in ihren Sequenzen und haben speziell konservierte Regionen.

So haben alle TRPs außer TRPA und TRPP eine TRP domain (im Bild: TRP). TRPCs, TRPV, TRPA und TRPN enthalten alle mehrere N-terminale *ankyrin repeats* (Ank). TRPCs enthalten auch eine *coiled-coil* Region (c-c) und eine Calmodulin/IP₃-Rezeptor Bindungsstelle (CIRB). Der TRPC5 besitzt insgesamt elf mögliche Phosphorylierungsstellen, wobei eine (P) in einer Region liegt, die das Bindungsmotiv VTTLR für den "*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*" (NHERF) enthält. Abbildung modifiziert nach (Vazquez, Wedel, Aziz, et al. 2004, Zhu et al. 2005, Venkatachalam and Montell 2007).

B: Vier TRP-Proteine bilden die Ionenkanalpore (Flockerzi 2007).

B



1.2. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der TRP-Kanäle

TRP-Kanäle werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert – so konnte die mRNA von 22 verschiedenen Mitgliedern mittels RT-PCR in Zellen aus Aorta, Lunge, Niere, Herz, Muskel, Geschlechtsorganen und dem zentralen Nervensystem (ZNS) der Maus nachgewiesen werden (Kunert-Keil et al. 2006, Riccio et al. 2002).

Wie das breite Expressionsmuster schon vermuten lässt, sind TRP-Kanäle an einer Reihe von physiologischen Prozessen in erregbaren und nichterregbaren Zellen beteiligt. Eine entscheidende Funktion der TRP-Kanäle ist die Verarbeitung von externen Signalen (Clapham 2003). So sind sie an Vorgängen beteiligt, durch die Lebewesen ihre Umwelt wahrnehmen, wie Sehen (z.B. der dTRP der *Drosophila*), Schmerzreize (z.B. der für das aus Chili gewonnene Capsaicin empfindliche TRPV1), Pheromondetektion (z.B. der TRPC2 bei der Pheromontransduktion der Maus), Hören (z.B. findet sich der TRPML3 in inneren und äußeren Haarzellen des Corti-Organs) und die Temperaturwahrnehmung (z.B. die TRPV-Familie oder TRPM8).

TRP-Kanäle ermöglichen jedoch auch einzelnen Zellen Signale zu erkennen und umzusetzen. Dabei konnte zum Teil einem einzigen Kanal die Beteiligung an verschiedenen Signalwegen für sehr unterschiedliche Zellfunktionen nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit behandelte TRPC5 hat vor allem eine Funktion in den Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und scheint dabei das Neuronenwachstum, aber auch die synaptische Transmitterfreisetzung in verschiedenen Arealen des Gehirns zu beeinflussen (vgl. Kapitel 1.4.). Ihm wird jedoch auch eine Rolle beim Ca^{2+} -Einstrom in glatten Muskelzellen oder eine

Beteiligung an der pathologischen Hypertrophie von Herzmuskelzellen zugeschrieben (Zholos 2014).

Da TRP-Kanäle in so verschiedenen physiologischen Vorgängen eine Rolle spielen, ist leicht vorstellbar, dass sie auch an unterschiedlichsten pathophysiologischen Vorgängen beteiligt sind. Betrachtet man nur die durch Einzelmutationen eines TRP-Gens verursachten Funktionsstörungen (sog. Kanalopathien), so sind rund ein Dutzend Krankheiten bekannt, die sich auf das ZNS, den muskuloskelettalen Apparat, die Nieren, die Augen, das Herz und den Stoffwechsel verteilen (Nilius and Owsianik 2010).

Wie diese knappe Zusammenfassung im Ansatz zeigt, sind in den letzten Jahren zahlreiche physiologische Prozesse und Krankheiten, an denen TRP-Kanäle beteiligt sind, entdeckt worden. Eine ausführliche Übersicht bieten auch die Bücher "Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels" (Nilius and Flockerzi 2014).

Das Verständnis davon, wie die Aktivität der TRP-Kanäle auf molekularer Ebene reguliert wird, bleibt bisher jedoch eher unvollständig und einige Befunde sind widersprüchlich.

1.3. Die Subfamilie der TRPC-Kanäle

Die Subfamilie der TRPC-Kanäle wurde schon als diejenige vorgestellt, die in ihrer Aminosäuresequenz von der ursprünglichen TRP-Mutante in der *Drosophila melanogaster* am wenigsten abweicht. Ihr gehören 7 verschiedene nichtselektive Kationenkanäle an - TRPC1 bis 7. Der TRPC2 gilt beim Menschen bisher als Pseudogen, in der Maus ist er jedoch, wie oben schon erwähnt, für die Pheromontransduktion entscheidend.

TRPC-Kanäle werden aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz noch einmal in vier Untergruppen zusammengefasst. TRPC1 und 2 bilden jeweils eine eigenständige Gruppe, während TRPC3, 6 und 7 zur Gruppe 3 zusammengefasst werden. TRPC4 und 5 (Gruppe 4) zeichnen sich neben den Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz dadurch aus, dass sie als einzige das Motiv VTTLR am C-terminalen Ende enthalten (vgl. Abb. 1.1), welches eine Interaktion mit dem *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor* (NHERF) ermöglicht. Oft wird jedoch TRPC1 aufgrund seiner Strukturähnlichkeit auch zur Gruppe aus TRPC4 und 5 dazu gerechnet (Montell et al. 2002, Clapham et al. 2005).

1.4. TRPC-Kanäle im Zentralen Nervensystem (ZNS)

In neuronalen Prozessen spielt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration eine zentrale Rolle. Sie beeinflusst die Erregbarkeit der Nervenzellen, ebenso wie die Freisetzung von Botenstoffen, das Zellwachstum oder die Ausbildung von Zellkontakten (Berridge, Bootman, and Roderick 2003, Alberts, Bray, and Hopkin 2012). Als nichtselektive Kationenkanäle mit einer Leitfähigkeit für Ca^{2+} spielen daher auch die TRPC-Kanäle eine wichtige Rolle im ZNS, wo sie durch Rezeptoren für Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren PLC-abhängig aktiviert werden. Durch den Einstrom von Na^{+} - und Ca^{2+} -Ionen führt eine Aktivierung von TRPC-Kanälen außerdem zu einer Depolarisation der Zellmembran von Neuronen und beeinflusst auf diese Weise deren Erregbarkeit. Im Folgenden werden Beispiele für bisher beschriebene Funktionen von TRPC-Kanälen im ZNS dargestellt, wobei vor allem die in dieser Arbeit behandelte Gruppe 4 hervorgehoben werden soll. TRPC1 beeinflusst die Zellerregbarkeit in hippokampalen CA1 Neuronen (Kepura 2010). TRPC3 findet sich u.a. in Purkinje-Zellen des Kleinhirns der Maus und

scheint dort ebenso auf die Koordination der Motorik Einfluss zu haben (Hartmann et al. 2008), wie vermutlich auch im Zusammenspiel mit dem TRPC7 in Interneuronen des Striatums (Berg, Sen, and Bayliss 2007). Für den TRPC4 ist eine Beteiligung an der Ausschüttung des Botenstoffs GABA in Interneuronen des Thalamus beschrieben (Munsch et al. 2003). TRPC5 fand sich schon bei seiner Erstbeschreibung vor allem in Zellen des zentralen Nervensystems (Okada et al. 1998). TRPC5-Knockout-Mäuse zeigten zwei sich ergänzende Veränderungen: Zum Einen waren die Stromantworten nach Rezeptoraktivierung in Neuronen der Amygdala im Gegensatz zum Wildtyp verändert. Zum Anderen zeigten diese Tiere ein vermindertes Vermeidungsverhalten auf aversive Reize hin. Beides lässt eine Beteiligung des TRPC5 an unserem Angstverhalten vermuten, da die Amygdala eine Region des Großhirns darstellt, der eine entscheidende Funktion für die Empfindung von Angst zugeschrieben wird (Riccio et al. 2009). Der Hippokampus ist eine zweite Region des ZNS, in dem der TRPC5 eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Tai et al. 2011). In Neuronen dieser Region wird er in den Wachstumskegeln angereichert, wo er im Zusammenspiel mit Ca^{2+} und Calmodulin das Auswachsen von Neuriten hemmt und damit auf die Morphologie der Neurone eine entscheidende Auswirkung hat (Greka et al. 2003, Davare et al. 2009, He et al. 2012). In Pyramidenzellen des Großhirns ist er außerdem zusammen mit dem TRPC6 für eine rezeptorgesteuerte langsame Nachdepolarisation verantwortlich (Yan, Villalobos, and Andrade 2009).

Diese bei weitem nicht vollständige Auflistung unterstreicht die Bedeutung von allen TRPC-Isoformen in den Zellen des zentralen Nervensystems, wobei auch auf diesem Feld ein Verständnis über die physiologische Bedeutung und Funktion der TRPC-Kanäle erst in Anfängen besteht.

1.5. Aktivierungsmechanismen für TRPC-Kanäle

Die Aktivität der TRP-Kanäle im Allgemeinen, auch die der *canonical* TRPs, wird durch vielfältige Mechanismen reguliert. Deshalb werden sie oft auch als „*Integratoren für multiple Zellsignale*“ bezeichnet (Soboloff et al. 2007). An dieser Stelle wird gezielt auf die Aktivierung und Regulation der TRPCs eingegangen - wobei viele dieser Mechanismen auch bei anderen Ionenkanälen und TRPs zu beobachten sind.

Putney (2005) nennt drei Wege, auf denen TRPC-Kanäle aktiviert werden können:

1. Über G_q -gekoppelte Rezeptoren (*G-Protein coupled receptor*, GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK)
2. Durch die Entleerung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern
3. Durch einen vermehrten Einbau in die Zellmembran

Während über den ersten Weg Einigkeit herrscht, ist die Bedeutung der Entleerung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in der Literatur stark umstritten. Im Folgenden werden die genannten Aktivierungsmechanismen zusammengefasst und einander gegenübergestellt.

1.5.1. TRPC-Aktivierung durch G_q -gekoppelte Rezeptoren & RTK

G_q -Protein-koppelnde Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivieren die Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5,-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet (Abb. 1.2).

Schon für die Phototransduktion der *Drosophila melanogaster* war bekannt, dass bei der Signalkaskade über Rhodopsin und G_q -Proteine die Phospholipase C (PLC) aktiviert werden muss, um den dTRP zu öffnen (Montell 1999). Auf der Suche nach einem Korrelat in Säugetieren stieß man schließlich auf die TRPCs, welche

ebenso über Rezeptor-Gesteuerte, PLC-abhängige Signalwege aktiviert werden konnten (Philipp et al. 1996, Boulay et al. 1997, Zhu, Jiang, and Birnbaumer 1998, Okada et al. 1998, Okada et al. 1999).

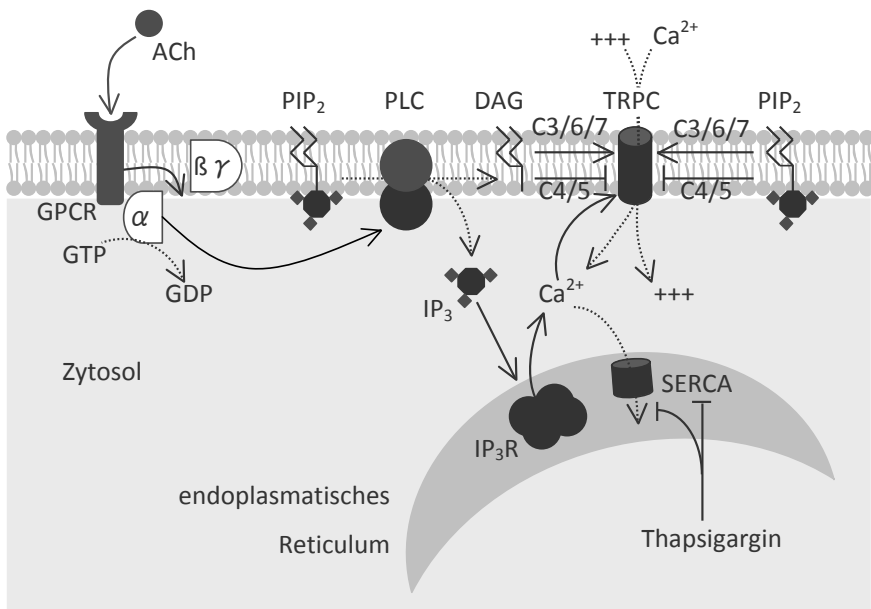


Abbildung 1.2 Aktivierungsmechanismen für TRPC-Kanäle

Legende: gestrichelte Pfeile - Bewegungen; durchgezogene Pfeile - Aktivierungen; Linien mit Balken - Blockierungen; GPCR - *G-Protein-coupled receptor*; ACh - Acetylcholin; GDP - Guanosin-Diphosphat; GTP - Guanosin-Triphosphat; PLC - Phospholipase C; PIP₂ - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; IP₃ - Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG - Diacylglycerin; IP₃R - IP₃-Rezeptor; +++ - Kationen; SERCA - *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*

Erläuterungen: Ein GPCR bindet auf seiner intrazellulären Seite ein G_q-Protein, welches im Ruhezustand des Rezeptors seinerseits ein GDP bindet. Wird der Rezeptor durch die Bindung eines extrazellulären Liganden (z.B. ACh) aktiviert, wird das GDP durch ein GTP ersetzt und das G_q-Protein zerfällt in eine α- und eine βγ-Untereinheit. Die Erstgenannte stimuliert die PLC vom β-Subtyp (PLCβ),

welche PIP_2 in IP_3 und DAG spaltet. Auf einem alternativen Weg kann die $\text{PLC}\gamma$ via Phosphorylierung durch die Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert werden und spaltet dann ebenfalls PIP_2 in IP_3 und DAG (im Bild nicht dargestellt). DAG kann TRPC2, 3, 6 und 7 aktivieren. IP_3 bindet an seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), dem bedeutendsten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Die Bindung führt zu einer Entleerung des Ca^{2+} -Speichers (*store depletion*) und damit zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Es wird diskutiert, ob *store depletion* und der $\text{IP}_3/\text{IP}_3\text{R}$ -Komplex TRPC-Kanäle aktivieren können. Das intrazelluläre Ca^{2+} wird von der SERCA wieder in das ER gepumpt. Wird die SERCA durch Thapsigargin gehemmt, wird künstlich ein *store depletion* erzeugt. PIP_2 selbst aktiviert TRPC3, 6 und 7 hat jedoch einen inhibierenden Einfluss auf TRPC4 und 5 - sein Abbau führt zu deren Aktivierung. Abbildung modifiziert nach (Clapham 2007)

Diese Rezeptoraktivierung konnte durch zahlreiche Experimente bei exogener Expression in z.B. HEK293-Zellen und in nativen Zellen, wie z.B. glatten Muskelzellen, bestätigt werden (Hofmann et al. 1999, Li, Xu, and Montell 1999, Schaefer et al. 2000, Inoue et al. 2001, Kanki et al. 2001, Lee et al. 2003, Jung et al. 2002, Venkatachalam, Zheng, and Gill 2003). Welche Mechanismen nach der Aktivierung der Phospholipase C für die Öffnung der TRPC-Kanäle verantwortlich sind, ist bis heute Gegenstand der Forschung. Sowohl für das Substrat PIP_2 , als auch für die beiden Spaltprodukte IP_3 und DAG gibt es Hinweise, dass sie die Offenwahrscheinlichkeit der TRPC-Kanäle beeinflussen.

Hofmann et al. (1999) konnten zeigen, dass DAG-Analoga wie z.B. OAG (*oleyl-acetyl-glycerol*) und die Akkumulation von zellulärem DAG durch Hemmung des DAG-Abbaus (vgl. Abb. 1.3) in CHO-K1-Zellen TRPC3 und 6 aktivieren. TRPC1, 4 und 5 zeigten keine DAG-Sensitivität. Da die Aktivierung von TRPC3 und 6 auch in „*excised patches*“ beobachtet wurde, gingen die Autoren von einem direkten Aktivierungsmechanismus von DAG ohne Co-Faktoren aus. Der mit TRPC3 und 6 eng verwandte TRPC7 konnte durch eine andere Arbeitsgruppe ebenso durch DAG aktiviert werden (Okada et al. 1999), wie der TRPC2 (Lucas et al. 2003). Eine Reihe

von weiteren Studien unterstützen diese Ergebnisse (Lintschinger et al. 2000, Zhang and Saffen 2001, Trebak et al. 2003, Venkatachalam, Zheng, and Gill 2003), wobei gezeigt werden konnte, dass DAG dabei vielleicht doch Co-Faktoren, wie z.B. die Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase Src, benötigt (Vazquez, Wedel, Kawasaki, et al. 2004, Smyth et al. 2006).

Einer dieser Co-Faktoren könnte auch das Substrat der PLC Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) sein, für das ein positiver oder inhibierender Einfluss auf viele andere TRP-Kanäle nachgewiesen ist (Rohacs and Nilius 2007). TRPC3, 6 und 7 konnten unterschiedlich stark in inside-out Patch-Clamp-Messungen mit PIP_2 aktiviert werden (Lemonnier, Trebak, and Putney 2008). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in Whole-Cell Patch-Clamp Messungen zeigen, dass eine Verringerung der PIP- und/oder PIP_2 -Konzentration in HEK293-Zellen den TRPC5 aktivieren. Hingegen konnten zuvor aktivierte TRPC5-Ströme durch PIP und PIP_2 in der Patch-Pipette zum Teil inhibiert werden. Bei Einzelkanalmessungen konnte der TRPC5 mit PIP_2 hingegen aktiviert werden. Diese an sich widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, dass Phosphoinositole ein Co-Faktor bei der Aktivierung auch des TRPC5 sind (Trebak et al. 2009). Auf den nächsten Verwandten des TRPC5, den TRPC4, könnte PIP_2 ebenso einen inhibitorischen Einfluss haben. Zusammen mit anderen Bindungsproteinen lagert sich PIP_2 dem C-terminalen Ende des TRPC4 an und stabilisiert in diesem Komplex womöglich eine inaktive Form des Kanals. Ein Aufbrechen dieses Zusammenschlusses z.B. durch die Entfernung von PIP_2 oder eine Manipulation des Zytoskeletts würde dann zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit des Kanals führen (Otsuguro et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die durch eine Rezeptoraktivierung beeinflusste Konzentration des Substrats PIP_2 , als auch die des Produktes DAG einen regulierenden Einfluss auf die Aktivität der TRPC-Kanäle

haben. Dabei scheinen die Einflüsse auf die jeweiligen Subfamilien unterschiedlich zu sein und bisher nur ansatzweise verstanden.

1.5.2. TRPC-Aktivierung durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher

Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), das zweite Produkt der PLC, bindet seinen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, was zu einer Freisetzung des dort gespeicherten Ca^{2+} führt (engl. *store-depletion*). Die Folge ist eine Anhebung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Zusätzlich werden Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran geöffnet, durch die noch mehr Ca^{2+} vom Extrazellulärraum in das Zellinnere gelangt (vgl. Abb. 1.2). Dieser Vorgang wird im Englischen als *store-operated-calcium-entry* (SOCE) bezeichnet (Berridge 1995). Seit ihrer Entdeckung gelten die TRPC-Kanäle als Kandidaten für eine Beteiligung am SOCE (Wes et al. 1995).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten über eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (z.B. durch die Infusion von IP_3 oder den Einsatz von Thapsigargin) einen Ca^{2+} -Einstrom durch TRPC1, 3, 4 und 5 auslösen (Zhu et al. 1996, Philipp et al. 1996, Philipp et al. 1998, Groschner et al. 1998, Tomita et al. 1998, Vazquez et al. 2001) oder durch Antisense-Knock-down die Beteiligung von TRPC1 und 3 am SOCE nachweisen (Zhu et al. 1996, Tomita et al. 1998, Liu et al. 2000, Liu, Singh, and Ambudkar 2003). Andere Veröffentlichungen zeigten eine Interaktion des IP_3 -Rezeptors mit TRPC3 und 7 (Kiselyov et al. 1998, Kiselyov et al. 1999, Boulay et al. 1999, Zhang et al. 2001). Eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse allerdings nicht reproduzieren und kamen zu dem Schluss, dass TRPCs weder durch IP_3 aktiviert werden, noch am SOCE beteiligt sind (Hofmann et al. 1999, Okada et al. 1999, Schaefer et al. 2000, Jung et al. 2002, Trebak et al. 2003, Venkatachalam, Zheng, and Gill 2003).

Es zeigte sich in späteren Arbeiten, dass die TRPC-Kanäle unter bestimmten Voraussetzungen am SOCE beteiligt sein können (Trebak et al. 2002, Vazquez et al. 2003, Liao et al. 2009, Liao et al. 2008), aber viele andere Proteine wie unter anderem Orai1 (Vig et al. 2006, Feske et al. 2006), STIM (Liou et al. 2005, Roos et al. 2005), SERCA, Calmodulin und EB1 (Vaca 2010) für die Aktivierung des SOCE verantwortlich sind. Diese Proteine können mit TRPC-Kanälen interagieren und vor allem TRPC-Heteromere, die TRPC1 und 4 enthalten, scheinen durch die Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern aktivierbar zu sein (Ong et al. 2014, Cheng et al. 2013).

Da sich diese Arbeit auf die durch DAG vermittelten Effekte auf TRPC-Kanäle beschränkt, wird hier nicht ausführlicher auf den SOCE eingegangen.

1.5.3. Einbau der TRPCs in die Zellmembran

Ein dritter Weg TRPC-Kanäle zu beeinflussen wurde von Bezzerides (2004) für den TRPC5 aufgezeigt. Mit *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) markierte TRPC5-Kanäle sind in der Fluoreszenzmikroskopie nicht nur an der Zelloberfläche von HEK293-Zellen sichtbar, sondern auch als punktförmige Strukturen knapp unterhalb der Zellmembran (Schaefer et al. 2000). Durch eine Stimulierung der Zelle mit dem Wachstumsfaktor EGF werden diese Vesikel-ähnlichen Strukturen in die Zellmembran eingebaut, wodurch die Anzahl der TRPC5-Kanäle in der Zellmembran gesteigert wird (Bezzerides et al. 2004). Interessanterweise wurden in dieser Arbeit die TRPC5-Kanäle dabei nicht aktiviert, obwohl in vorhergehenden Studien gezeigt worden war, dass TRPC4 und 5 über den EGF-Rezeptor und eine darauf folgende Stimulierung der PLC γ aktiviert werden (Schaefer et al. 2000). Sehr ähnliche Experimente führten beim TRPC3 zu demselben Ergebnis (Smyth et al. 2006).

1.5.4. Zusammenfassung der Aktivierungsmöglichkeiten für TRPC5

Anhand dieser kurzen Übersicht lässt sich nachvollziehen, wie komplex die Aktivität der TRPC-Kanäle reguliert wird und wie eng die einzelnen Aktivierungswege zusammenhängen. Bei weitem ist dies kein vollständiger Überblick, da für jeden einzelnen TRPC weitere spezielle Beobachtungen zu den genannten Signalwegen und zusätzliche direkte und indirekte Aktivatoren existieren. Außerdem können sich die Eigenschaften der Kanäle verändern, wenn sie als Heterotetramere (z.B. eine Kombination aus TRPC1- und 5-Proteinen) vorliegen (Strübing et al. 2001, Bezzerides et al. 2004), intrazellulär Proteine gebunden sind (Kim et al. 2006, Kinoshita-Kawada et al. 2005) oder sie phosphoryliert werden (Venkatachalam, Zheng, and Gill 2003, Trebak et al. 2005). Eine tabellarische Übersicht über die bisher bekannten Aktivatoren und Inhibitoren der TRPC-Kanäle findet sich im Anhang (vgl. Kapitel 5.2).

Allein für den TRPC5, dessen Aktivierung im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll, sind vielfältige Aktivierungsmechanismen bekannt. Es gilt als gesichert, dass TRPC5 durch G_q -Protein-koppelnde Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen abhängig von der Phospholipase C und nicht über die Entleerung von intrazellulären Calcium-Speichern aktiviert wird (Schaefer et al. 2000). Wie der Aktivierungsweg ab der PLC erfolgt, ist bisher unbekannt. TRPC5 zeigt außerdem eine gewisse Spontanaktivität und ist durch das G-Protein stimulierende $GTP\gamma S$ weiter aktivierbar (Schaefer et al. 2000, Yamada et al. 2000). Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass intra- und extrazelluläres Calcium die Aktivität des TRPC5 beeinflusst (Zeng et al. 2004, Jung et al. 2003, Schaefer et al. 2000) und dass ein Anheben der intrazellulären Calcium-Konzentration ohne Co-Faktoren zu einer Aktivierung des TRPC5 führt

(Gross et al. 2009, Blair, Kaczmarek, and Clapham 2009). Direkte extrazelluläre Aktivatoren sind Pb^{2+} , Lanthanoide, H^+ , Thioredoxin, NO und H_2O_2 (Zholos 2014). Eine besondere Eigenschaft des TRPC4 und 5 ist, dass ihre Offenwahrscheinlichkeit durch La^{3+} und Gd^{3+} in micromolaren Konzentrationen deutlich gesteigert werden kann (Obukhov and Nowycky 2008, Jung et al. 2003). Und wie bereits im Abschnitt 1.5.1. erwähnt, haben verschiedene Lipide aktivierende und inhibierende Einflüsse. PIP_2 hemmt den TRPC5, während sein Abbau zu einer Aktivierung führt (Trebak et al. 2009). Lysophosphatidylcholin (LPC) scheint hingegen ein direkter Aktivator des Kanals zu sein (Flemming et al. 2006). Auch physikalische Faktoren (Kälte, Membrandehnung) konnten TRPC5 in verschiedenen Studien aktivieren. Eine aktuelle Übersichtsarbeit auch über die Aktivierungsmechanismen des TRPC5 hat Zholos (2014) verfasst.

1.6. Inaktivierung der TRPC-Kanäle durch die PKC

Eine konstant hohe Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol ist für die Zelle auf Dauer toxisch. Deshalb muss es Mechanismen geben, welche Ca^{2+} -permeable Kanäle nach einer Aktivierung schnell wieder abschalten. Das eingeströmte Ca^{2+} wird gleichzeitig in den intrazellulären Speicher (das endoplasmatische Retikulum) oder aus der Zelle heraus transportiert (vgl. Abb. 1.2). Auf diese Weise hält die Zelle in ihrem Inneren die Ca^{2+} -Konzentration in Ruhephasen auf einem niedrigen Niveau (Alberts, Bray, and Hopkin 2012).

Schon für den Sehvorgang der *Drosophila melanogaster* war bekannt, dass die *eye-specific protein kinase C* (ePKC - eine spezielle Variante des Enzyms, welches nur im Auge der *Drosophila* vorkommt) für die Beendigung der Antwort auf Lichtreize eine entscheidende Rolle spielt (Hardie et al. 1993, Smith et al. 1991).

Es konnte auch gezeigt werden, dass die ePKC den dTRP direkt phosphoryliert (Huber et al. 1998). Diese Ergebnisse ließen die Autoren über einen biphasischen Regulationsmechanismus für das An- und Abschalten des dTRPs spekulieren: Der Kanal öffnet auf ein PLC-abhängiges Signal hin und es kommt zum Ca^{2+} -Einstrom. Calcium aktiviert zusammen mit dem PLC-Produkt DAG die PKC (Clapham 2007, van Rossum and Patterson 2009), welche nach den neuen Beobachtungen durch direkte Phosphorylierung den dTRP wieder inaktiviert (Abb. 1.3). Die PLC wäre demnach der Ausgangspunkt für eine rasche Aktivierung und eine gleichzeitig beginnende, aber langsamer ablaufende Inaktivierung des Kanals.

Der gleiche Feedbackmechanismus wurde für TRPC3, 4 und 5 bestätigt (Venkatachalam, Zheng, and Gill 2003). Die Autoren nutzten aus, dass DAG einem ständigen Auf- und Abbauprozess unterliegt (Abb. 1.3): Es entsteht bei der Spaltung von PIP_2 durch die PLC und wird von der DAG-Lipase und -Kinase weiter verstoffwechselt. Durch DAG-Lipase bzw. -Kinase Blocker (RHC80267, R59949) konnten die Autoren die DAG-Konzentration in ihren HEK293- und DT40-Zellen erhöhen. Auf diesem Weg bestätigten Sie zunächst noch einmal, dass TRPC4 und 5 im Gegensatz zum TRPC3 nicht durch DAG aktivierbar sind. Auch durch das membrangängige DAG-Analogon OAG waren sie nicht aktivierbar. Es zeigte sich nun aber zusätzlich, dass eine erhöhte DAG-Konzentration die Aktivierung von TRPC4 und 5 durch Rezeptorstimulation vollständig blockiert. Eine Inhibition der PKC durch das Bisindolylmaleimid BIM-I (GF109203X) konnte den inhibitorischen Effekt wieder aufheben, sodass TRPC4 und 5 wieder durch Rezeptorstimulation aktivierbar waren. Zusätzlich konnten sie die Dauer der OAG-Aktivierung des TRPC3 durch eine PKC-Blockade verlängern. Auf der anderen Seite hob eine Stimulation der PKC durch den Phorboldiester phorbol 12-myristat 13-Azetat

(PMA) die Aktivierbarkeit des TRPC3 durch OAG auf. Diese Beobachtungen zeigen, dass die PKC auf TRPC3, 4 und 5 einen hemmenden Einfluss hat.

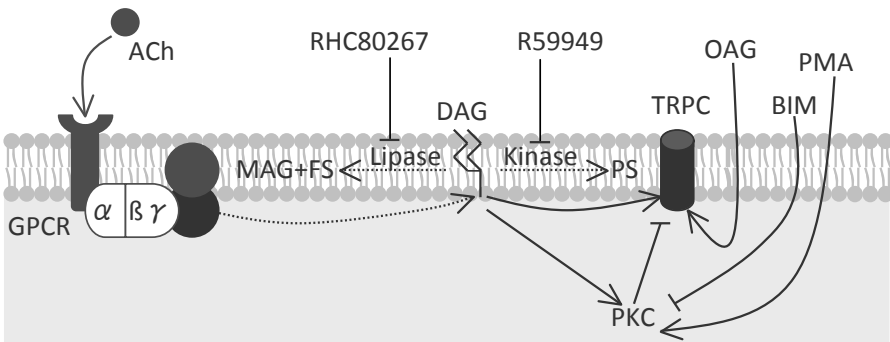


Abbildung 1.3 Zusammenspiel von DAG, PKC und TRPC

Legende: gestrichelte Pfeile - Bewegungen; durchgezogene Pfeile - Aktivierungen; Linien mit Balken - Blockierungen; GPCR, ACh, PLC, DAG, $\alpha/\beta\gamma$ - siehe Abb. 1.2; MAG - Monoacylglycerol; FS - Fettsäure; PS - Phosphatidsäure; PKC - Proteinkinase C; OAG, BIM-I, PMA, RHC80267, R59949 - siehe Text.

Erläuterungen: Eine erhöhte DAG-Konzentration (durch Rezeptorstimulation oder durch Hemmung des Abbaus mittels Inhibitoren der DAG-Kinase oder -Lipase) führt auf direktem Weg zu einer Aktivierung von TRPC2, 3, 6 und 7. Über eine Aktivierung der PKC führt DAG indirekt (und damit verzögert) wieder zu einer Desaktivierung von TRPC3 bis 7. BIM-I hemmt diese Desaktivierung, PMA kann sie verstärken. OAG als lösliches DAG-Analogon kann TRPC2, 3, 6 und 7 direkt aktivieren.

In den folgenden Jahren konnten diese Beobachtungen reproduziert und mögliche Phosphorylierungsstellen für einzelne TRPC-Kanäle gefunden werden. Mögliche Aminosäuren dafür sind Serin (Aminosäurecode: S), Threonin (T) und Tyrosin (Y). Diese können an den Hydroxylgruppen ihrer Seitenketten durch Proteinkinasen eine Phosphat-Gruppe angehängt bekommen (Müller-Esterl 2004). Zhu (2005) nennt 11 mögliche Phosphorylierungsstellen auf der zytoplasmatischen Seite des TRPC5, wobei durch die Punktmutationen von drei dieser Stellen das Abschalten

des TRPC5 besonders beeinflusst wurde: Serin an Position 752 bzw. 666 und vor allem das Threonin an Position 972. An ihrer Stelle wurde in drei verschiedenen Mutanten jeweils die Aminosäure Alanin (A) eingefügt. Die Mutante TRPC5-T972A zeigte eine stark verlängerte Öffnungszeit (bzw. verspätetes Abschalten) nach einer Rezeptoraktivierung im Vergleich zum Wildtyp (Zhu et al. 2005). Für den in HEK-293-Zellen transfizierten TRPC3 konnte gezeigt werden, dass er im Anschluss an eine Behandlung der Zellen mit PMA vermehrt phosphoryliert vorliegt. Die TRPC3 Mutante S712A wurde im selben Experiment weit weniger phosphoryliert. Eine Behandlung mit PMA konnte eine Aktivierung dieser TRPC3-Mutante auch nicht verhindern (Trebak et al. 2005). Für den TRPC6 konnte analog zu seinem engen Verwandten TRPC3 gezeigt werden, dass eine Inhibition der PKC zu einer Zunahme bzw. eine Aktivierung der PKC zu einer Abnahme des durch OAG aktivierten Ca^{2+} -Einstroms führen. Außerdem lag TRPC6 nach einer Rezeptoraktivierung durch Carbachol (CCh) vermehrt phosphoryliert vor, was durch eine Inhibition der PKC verhindert werden konnte (Bousquet, Monet, and Boulay 2010). Zusätzlich sind für TRPC6 zwei potentielle Phosphorylierungsstellen beschrieben worden: Im heterologen HEK293-Zellmodell konnte die Mutante S448A nicht durch die PKC phosphoryliert werden (Bousquet, Monet, and Boulay 2010), während in neuronalen PC12D-Zellen eine Mutation des Serins an Position 768 eine Phosphorylierung verhinderte (Kim and Saffen 2005). In der glatten Muskelzelllinie A7r5 und den oben schon erwähnten PC12D-Zellen, die beide endogen den TRPC6 exprimieren, konnte der Einfluss der PKC auf diesen Kanal erneut nachgewiesen werden (Bousquet, Monet, and Boulay 2010, Kim and Saffen 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das aus der *Drosophila* bekannte biphasische Modell zur Regulierung der dTRP-Öffnung im Anschluss an die PLC-

Aktivität (mit einem schnellen Aktivierungs- und einem langsameren PKC-abhängigen Inaktivierungssignal) auch auf die TRPCs übertragen werden kann. Die einzige Ausnahme scheint dabei der TRPC1 zu sein, der in mehreren Studien PKC-abhängig aktiviert werden konnte (Saleh et al. 2006, Saleh, Albert, and Large 2009, Rey et al. 2006).

Der Vollständigkeit halber sollte an dieser Stelle erwähnt sein, dass auch für andere Proteine eine Beteiligung an der Inaktivierung der TRPC-Kanäle bekannt ist. So konnte z.B. Calmodulin den Ca^{2+} -Strom durch den TRPC6 unabhängig von der PKC inhibieren (Zhang et al. 2001). Eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A über eine Stimulation durch G_s -koppelnde Rezeptoren und den second messenger cAMP konnte einen durch GTPyS aktivierten Ionenstrom durch den TRPC5 beenden (Sung et al. 2011).

1.7. DAG-Sensitivität von TRPC4 und TRPC5

Im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit hat unsere Arbeitsgruppe neue Beobachtungen über die Aktivierbarkeit des TRPC5 durch DAG gemacht. Bisher galt, wie oben beschrieben, die Subgruppe aus TRPC4 und 5 nach den Beobachtungen aus zahlreichen Studien als unsensibel für DAG und sein Analogon OAG. Einzig Lee et al. (2003) konnten in Zellen des Magens der Maus einen durch OAG aktivierbaren Kationenstrom nachweisen, wobei sie aufgrund der elektrophysiologischen Eigenschaften des untersuchten Ionenkanals davon ausgingen, dass TRPC5 für den Ionenstrom verantwortlich war. Ebenso war in dieser Studie der TRPC5 in HEK293-Zellen durch OAG aktivierbar.

In Messungen unserer Arbeitsgruppe wurden TRPC4 und 5 nur dann für DAG sensitiv, wenn sie zusammen mit einem G_q -koppelnden Rezeptor (H_1 -, M_5 -, AT_1 -

und B_2 -Rezeptor) in HEK293-Zellen exprimiert wurden. Die gleichen Beobachtungen wurden für den G_i -koppelnden M_2 -Rezeptor gemacht, während eine Kotransfektion mit dem G_s -koppelnden β_2 -Rezeptor zu keiner DAG-Sensitivität führte. Die Stimulation erfolgte dabei sowohl durch das DAG-Analogon OAG, als auch durch endogene DAG-Akkumulation mittels DAG-Lipase- und -Kinase-Inhibitoren in Patch-Clamp-Messungen. Diese Ergebnisse konnten in Fluorometrischen Calciummessungen und im Manganquenench sowohl in HEK293-Zellen, als auch in COS-7- und CHO-K1-Zellen bestätigt werden. Durch den Einsatz von verschiedenen PKC-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass diese DAG-Aktivierung des TRPC4 und 5, ebenso wie schon vorher für TRPC3, 6 und 7 beschrieben, nicht durch die PKC vermittelt wird (Ren 2007).

Experimente unserer Arbeitsgruppe, die mit den Ergebnissen dieser Arbeit zur Veröffentlichung eingereicht wurden, konnten weiterhin zeigen, dass TRPC4 und 5 ohne die Koexpression eines Rezeptors in HEK293-Zellen DAG-sensibel sind, wenn die PKC-Aktivität gehemmt ist. Berücksichtigt man die unter Abschnitt 1.6 beschriebene Beobachtung, dass TRPCs durch die PKC gehemmt werden, ergibt sich folgende Hypothese: Eine normale Aktivität der PKC führt zu einer Phosphorylierung von TRPC4 und 5. Im phosphorylierten Zustand sind beide Kanäle für DAG unsensitiv. Hemmt man die PKC durch direkte Inhibitoren wie Staurosporin oder Bisindolylmaleimid I (BIM-I) werden sie durch DAG aktivierbar. Eine Überexpression von G_q - oder G_i -koppelnden Rezeptoren über 3 Tage könnte in HEK293-, COS-7- oder CHO-K1-Zellen zu einer Reduktion der PKC-Aktivität und dadurch zu einer DAG-Sensitivität von heterolog exprimierten TRPC4 und 5 führen.

1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen die im Abschnitt 1.7 beschriebenen Beobachtungen weiter untersucht werden. Dazu sollen die schon beschriebenen TRPC5-Mutanten (Zhu et al. 2005), die aufgrund einer fehlenden Phosphorylierungsstelle eine verlängerte Öffnungszeit nach vorheriger Rezeptorstimulation zeigten, auf ihre OAG-Sensitivität hin untersucht werden.

Außerdem soll mittels der Quantifizierung der PKC-Aktivität durch Einsatz des PKC-PepTag[®]-Assays die Hypothese abgeklärt werden, ob eine Überexpression von G_q- oder G_i-koppelnden Rezeptoren in HEK293-Zellen zu einer verminderten Aktivität der PKC führt.

Da die bisherigen Beobachtungen alle in Zellmodellen mit einer Überexpression des TRPC4 bzw. 5 gemacht wurden, wäre es zudem interessant zu sehen, ob sie sich auch in Zellen bestätigen lassen, die die beiden Kanäle endogen enthalten. Als Kandidat für eine weitere Untersuchung des TRPC5 eignet sich die HT22-Zelllinie, welche aus immortalisierten hippocampalen Neuronen der Maus kloniert wurde (Morimoto and Koshland 1990, Davis and Maher 1994). Wie oben beschrieben ist der Hippokampus eine Region des ZNS, deren Neurone eine hohe Dichte an TRPC5-Kanälen aufweist. Eine Quantifizierung der mRNA-Level der HT22-Neurone für TRPC-Kanäle 1-6 mittels qRT-PCR zeigte, dass der TRPC5 zumindest auf mRNA-Ebene derjenige der untersuchten TRPCs war, der am häufigsten vorkam (Abb. 1.4.).

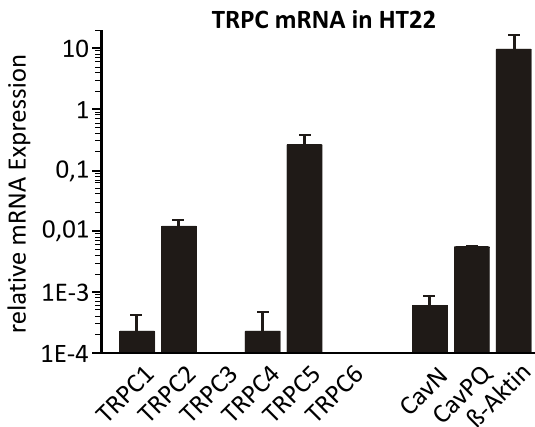


Abbildung 1.4 mRNA-Expression von TRPC1-6 in HT22-Zellen

Expressionslevel der mRNA von TRPC-Kanälen 1-6 und der zwei spannungsabhängigen Calcium-Kanäle CavN und CavPQ in HT22-Zellen in Relation zu den "housekeeping genes" *hypoxanthin phosphoribosyltransferase 1*, *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein* und *succinate dehydrogenase complex*. Die Bestimmung erfolgte mittels qRT-PCR. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ursula Storch zur Verfügung gestellt.

Die HT22-Zelllinie soll in Patch-Clamp-Messungen mit Hilfe verschiedener Agonisten, PKC-Inhibitoren und siRNAs daraufhin untersucht werden, ob der TRPC5 auch als funktionales Protein eine Rolle spielt und ob er bei einer PKC-Inhibition durch OAG aktivierbar ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Materialien, Geräte und Softwareprogramme

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit einer Bezeichnung der Hersteller findet sich im Anhang (Kapitel 5.3.). Auf eine Nennung dieser Kenndaten wird in den hier folgenden Abschnitten weitestgehend verzichtet.

2.2. Zellkultur und Transfektionen

2.2.1. Zellkultur

Für diese Arbeit wurden drei Zelllinien eingesetzt. Als heterologes Expressionssystem diente in den meisten Fällen die HEK293-Zelllinie, die aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney“) stammt. Die CHO-Zelllinie wurde versuchsweise für den PKC-Assay eingesetzt. Sie entstammt dem Ovar des chinesischen Hamsters („Chinese hamster ovary“). Beide Zelllinien zeigen nur eine geringe endogene Expression an mRNA für TRPC-Kanäle und nur wenig bis gar keine anderen funktionellen Ionenkanäle. Sie wurden bereits vielfach für die elektrophysiologische Charakterisierung der TRPC-Kanäle eingesetzt (Riccio et al. 2002).

Als homologes Zellmodell wurden immortalisierte hippokampale Neurone, die HT22-Zelllinie (Davis and Maher 1994, Morimoto and Koshland 1990), elektrophysiologisch charakterisiert und ihr Expressionsmuster an TRPC-Kanälen untersucht. Die Zellen wurden in 250 ml Flaschen mit je 20 ml Medium bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Brutschrank kultiviert.

Für die HEK293- wurde MEM, die HT22- DMEM und die CHO-Zellen Ham's F-12 als Medien verwendet, wobei diese mit 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt waren. Alle drei Zelllinien wurden ab einer geschätzten Konfluenz von >80% wie folgt passagiert: Absaugen des Mediums; Waschen mit 10 ml PBS; Ablösen durch Zugabe von 2 ml der 0,05%igen Trypsin-Lösung; Stoppen der Reaktion mit 10 ml des jeweiligen Nährmediums; vollständiges Ablösen der Zellen und Überführen des Gemischs in 50 ml Falcon-Tubes; Abzentrifugieren bei 1000 g für eine Minute; Absaugen des Überstandes und Resuspension in 10 ml des jeweiligen Mediums. Ab diesem Schritt konnten die Zellen in 1:10 bis 1:30 Verdünnungen weiter kultiviert werden.

Für die Patch-Clamp-Messungen wurden einige der aus den Flaschen abgelösten Zellen in 35-mm-Kulturschälchen, welche 1,5 ml des jeweiligen Mediums enthielten, überführt. Im Fall der HEK293-Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ungefähr 300.000 Zellen in die Schälchen ausgesät und anschließend für zwei Tage inkubiert. Von den HT22-Zellen wurden 100.000 für nur einen Tag auf Schälchen verteilt. Für den PepTag[®] Assay wurden 1,2 Millionen HEK293-Zellen (Versuchsweise auch 1 Millionen CHO-Zellen) in 100-mm-Kulturschalen für zwei Tage inkubiert.

2.2.2. Transfektionen

Im Anschluss an die Inkubationszeit in den Kulturschälchen wurden die Zellen mittels kationischer Lipide transfiziert. Für die Transfektionen der HEK293- und der CHO-Zellen wurde das Transfektionsmedium TransIT-LT1 verwendet. Dieses wurde für fünf Minuten in 100 µl des serumfreien Mediums vorinkubiert. Nun wurde die cDNA hinzugefügt und dieses Gemisch 25 weitere Minuten inkubiert, bevor es zu den vorbereiteten Zellen in die Kulturschälchen pipettiert werden

konnte. Dabei wurde, wie vom Hersteller empfohlen, immer dreimal so viel TransIT-LT1 (in μl) wie cDNA (in μg) verwendet. Die HT22-Neuronen wurden mit Fugene6[®] transfiziert. Die 100 μl serumfreies Medium, das Transfektionsreagenz und die pcDNA (im gleichen Mischungsverhältnis 3:1) konnten hierbei direkt vermischt, für 15 Minuten inkubiert und zu den Zellen gegeben werden.

Die Mengenverhältnisse der pcDNA waren in allen Patch-Clamp-Experimenten gleich. Es wurden 2 μg Kanal-pcDNA zusammen mit 0,5 μg Rezeptor-pcDNA transfiziert. Lag ein Vektor ohne Kodierung für ein Fluoreszenzprotein vor, wurde zusätzlich 0,1 μg EGFP-pcDNA transfiziert. Dabei war diese geringe Menge an Fluoreszenzprotein bewusst gewählt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass in fast allen Zellen, die Fluoreszenz zeigten, zusätzlich auch der Kanal und der Rezeptor vorlagen. Von der siRNA-pc-DNA wurde immer 1 μg transfiziert. Für die wesentlich größere Menge an Zellen, die für den PepTag[®] Assay eingesetzt wurden, erhöhte sich entsprechend die Menge an verwendeten Plasmiden: 10 μg Kanal mit 2,5 μg Rezeptor. Im Anschluß an die Transfektionen blieben die Zellen weitere drei Tage im Brutschrank.

2.2.3. *Vereinzeln der Zellen am Versuchstag*

Für die Patch-Clamp-Messung mussten die Zellen nach den insgesamt fünf Tagen in den Kulturschälchen noch einmal vereinzelt werden. Dazu wurden sie mit 1 ml PBS gewaschen, mit 0,3 ml Trypsinlösung vom Boden abgelöst, die Reaktion mit 1,5 ml des jeweiligen Mediums gestoppt und die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurde die Zellsuspension abhängig von der Zelldichte im Transfektionsschälchen auf vier bis sechs neue 35-mm-Kulturschälchen, die 1,5 ml des jeweiligen Mediums enthielten, verteilt. Die HEK293-Zellen mussten nun für mindestens zwei weitere Stunden im Brutschrank

am Boden der Schälchen anwachsen, damit sie die mechanischen Belastungen einer Patch-Clamp-Messung aushalten konnten. Die HT22-Zellen benötigten für das Anwachsen einen weit längeren Zeitraum und wurden deshalb schon am Abend vor dem Messtag vereinzelt.

2.3. Elektrophysiologie

2.3.1. Die Patch-Clamp-Technik

Mit der Patch-Clamp-Technik, für deren Einführung Erwin Neher und Bert Sakmann 1991 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten, lassen sich Ladungsverschiebungen durch Ionenkanäle in Zellmembranen messen (Neher and Sakmann 1976). Dazu wird eine mit Elektrolytlösung gefüllte Glaspipette auf einer Zelle aufgesetzt und ein kleiner Fleck (engl. „patch“) der Zellmembran durch einen Unterdruck in die Öffnung der Pipette hineingesaugt. Über zwei Silberchloridelektroden, eine in der Elektrolytlösung der Pipette (die Messelektrode) und eine in der Badlösung, die die Zellen umgibt (Bad- oder Referenzelektrode), können in verschiedenen Konfigurationen die elektrischen Eigenschaften dieses Membranflecks untersucht werden. Dabei ist entscheidend, dass durch die dichte Verbindung (engl. „seal“) zwischen der Zellmembran und dem Glas der Pipette ein sehr hoher elektrischer Widerstand zwischen der Badlösung und der Pipette geschaffen wird. Dieser Widerstand sollte im Bereich von mehreren Gigaohm liegen, was man dann als "Gigaseal" bezeichnet. Dadurch werden störende Einflussfaktoren, welche die Messergebnisse überlagern können (wie z.B. das Hintergrundrauschen), minimiert (vgl. Abb. 2.1).

Das Funktionsprinzip dieser Technik baut auf der Spannungsklemme (engl. „*voltage clamp*“), die von Cole und Curtis in den 1930er Jahren beschrieben

wurde, auf. Der Patch wird auf eine bestimmte Spannung (Kontrollspannung oder Kommandospannung) geklemmt (engl. „*clamp*“). Dazu wird die aktuelle Membranspannung gemessen und mit der Soll- oder Kommandospannung verglichen. Nun wird so viel Strom über die Kanäle des Membranflecks geleitet, dass sich die Spannung über dem Patch der Kommandospannung angleicht. Dieser Kompensationsstrom hat den gleichen Betrag wie der Strom, der durch die Ionenkanäle des Membranflecks fließt, ist diesem aber entgegen gerichtet.

Verwendeten Cole und Curtis noch zwei intrazelluläre Elektroden, um die Messung der Spannung und die Injektion des Kompensationsstroms zu verwirklichen, so benötigten Neher und Sakmann nur noch eine Elektroden dafür. Die Messelektrode ist dabei in der Lage, sowohl die Membranspannung zu messen, als auch den zum Angleichen benötigten Strom in die Zelle zu leiten (vgl. Abb. 2.2).

Die Patch-Clamp-Technik brachte einige entscheidende Vorteile. Während die zwei Einsteelektroden nur eine Messung der Ströme über die gesamte Zellmembran erlaubten, konnte dank der isolierenden Eigenschaft des Pipettenglases der Strom über ein sehr kleines Areal mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis 1 μm gemessen werden. Auf diese Weise lässt sich das Ein- und Ausschalten einzelner Kanäle beobachten. Die Patch-Clamp-Technik ermöglichte also erstmalig die direkte Untersuchung der physiologischen Eigenschaften verschiedener Kanaltypen (Neher and Sakmann 1976).

Außerdem wurde das Einstechen der beiden Messelektroden der herkömmlichen Spannungsklemme nur von sehr großen Zellen toleriert. Dank der Nutzung der Glaspipette und einer einzelnen Elektrode konnten nun auch sehr kleine Zellen die Experimente überstehen. Heute werden mit Hilfe des „Patchens“ Zellen in ihren

nativen Gewebeverbänden (Edwards et al. 1989) und sogar Zellen in lebenden Säugetieren (Margrie et al. 2003) elektrophysiologisch charakterisiert.

Dank der stabilen Verbindung zwischen der Zellmembran und der Glaspipette, die bei einem Giga-seal (Abb. 2.1) herrscht, lässt sich die Zellmembran aus der Zelle herausreißen oder durch weiteres Saugen eröffnen, ohne dass sich die dichte Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette löst. Dadurch lassen sich viele verschiedene Messanordnungen erreichen, die eine Charakterisierung von extra- und intrazellulären Einflussfaktoren auf die Ionenkanäle ermöglichen (Hamill et al. 1981).

2.3.2. *Praktische Durchführung einer Patch-Clamp Messung*

Die Schälchen mit den vorbereiteten Zellen werden in einer Halterung auf dem Mikroskoptisch des inversen Mikroskops fixiert. Eine Messkammer aus Plexiglas wird in die Schälchen eingesetzt und ein Schlauchsystem (Fließgeschwindigkeit 0,1 ml/Min.) mit verschiedenen Perfusorspritzen, Wegehähnen und einer Absaugpumpe für die Badlösungen, sowie die Referenzelektrode daran angeschlossen. Die Messkammer enthält einen zentralen Kanal (Länge x Breite x Höhe: 20 x 4 x 1,5 mm), der einen annähernd laminaren Fluss der Badlösung um die zu messenden Zellen ermöglicht. Dieses System aus Messkammer und Schläuchen ermöglicht einen reibungslosen Austausch mit minimalen Mengen der Badlösungen.

Für jede Messung wird eine frische Glaspipette aus Borosilikatglas mit Hilfe eines horizontalen Pullers gezogen. Der Puller erhitzt und dehnt die Kapillaren in drei Schritten bis sie zerreißen und poliert anschließend die Oberfläche, um beste Bedingungen für eine Anlagerung der Zellmembran an die Glaswand zu schaffen. Diese Pipetten werden mit ca. 6 µl einer Pipettenlösung befüllt und über der

Messelektrode eingespannt. Auf das Innere der Pipette wird über ein Schlauchsystem ein leichter Überdruck angelegt, um so einen schwachen Ausstrom der Pipettenlösung zu erzeugen, der ein Verschmutzen der sehr kleinen Öffnung der Pipettenspitze (\varnothing ca. 1 μm) verhindern soll.

Die Pipetten- und Badlösungen werden dabei in ihrer Zusammensetzung gezielt für die Fragestellung des Experiments entworfen. Die Bestandteile der hier verwendeten Lösungen finden sich im Kapitel 2.3.6.

Mittels einer Übersichtsvergrößerung des Mikroskops wird eine gut angewachsene, alleinstehende Zelle ausgesucht. Arbeitet man mit transfizierten Zellen, kann man mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe und entsprechenden Filtern eine Zelle aussuchen, die anhand ihrer Fluoreszenz eine ausreichende Expression der Transfizierten Proteine (Ionenkanäle, Rezeptoren u.a.) vermuten lässt. Unter Sichtkontrolle fährt man mit Hilfe des Mikromanipulators (ermöglicht Bewegungen auf 0,1 μm genau) die Glaspipette an die gewünschte Zelle heran. Sobald die Pipette mit der Messelektrode in die Badlösung eintaucht, entsteht ein geschlossener Stromkreislauf über die Badelektrode und die Antwort auf einen vom Verstärker generierten rechteckigen Testpuls (-5 mV für 5 ms) wird sichtbar. Dieser ermöglicht es, die Pipettenöffnung, die einen Widerstand im Stromkreislauf bildet, zu beurteilen und das Offsetpotential zu korrigieren (Details zu den Einstellungen der hier durchgeführten Messungen und der Korrektur verschiedener Messfehler werden weiter unten erläutert). Unter einer stärkeren Vergrößerung (40x) nähert man die Pipette immer weiter der gewünschten Zelle an, bis sich eine schwache Verformung der Zellmembran erahnen lässt (Abb. 2.1). In dieser Position stellt man den Überdruck, der auf der Glaspipette liegt, ab und die Zellmembran legt sich im Idealfall aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft dem Glas an und verlegt die Öffnung der Pipette. Dadurch entsteht ein Widerstand im

Fluss zwischen den beiden Elektroden – der Teststrom kann nicht mehr ungehindert fließen, was sich am Computerbildschirm genau verfolgen lässt. Indem man nun einen Unterdruck an die Pipette anlegt, saugt man die Zellmembran weiter in die Pipettenöffnung hinein. Dadurch lagert sich die Zellmembran so eng an die Glaswand an, dass der Widerstand sich immer weiter erhöht. Ziel ist es, einen Widerstand von mindestens einem Gigaohm („Giga-Seal“) zu erzeugen. Die Verbindung zwischen Zelle und Pipette ist gegenüber unkontrollierten Bewegungen sehr empfindlich, deshalb befindet sich die gesamte Messapparatur auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Dennoch ist die mechanische Belastbarkeit des Giga-Seals so hoch, dass sich aus diesem Zustand, der auch „Cell-attached-Modus“ genannt wird, noch weitere Messkonfigurationen erreichen lassen - wobei je nach Fragestellung eine andere Messkonfiguration gewählt wird. Durch nochmaliges kurzes, kräftiges Saugen kann man den Patch aufreißen und damit in den Whole-Cell-Modus gelangen. Durch den eröffneten Patch hat man nun Zugriff auf das Zytosol und kann die Ströme über die gesamte Zellmembran messen.

Beim Aufreißen des Membranflecks darf der Seal (die Verbindung zwischen Zellmembran und Pipettenglas) nicht verloren gehen, da sonst Leckströme entstehen. Zusätzlich muss man darauf achten, dass die Membran ausreichend eröffnet ist, da sonst der Zugriff der Messelektrode auf das Zellinnere durch einen zu großen Widerstand („Serienwiderstand“ – Details siehe unten) gestört ist. Durch den eröffneten Patch diffundiert die Pipettenlösung in das Zellinnere. Auf diese Weise gibt man die Zusammensetzung des Zellinneren durch die Pipettenlösung vor. Durch das Auswaschen des Zytosols können allerdings wichtige lösliche Zellbestandteile verlorengehen.

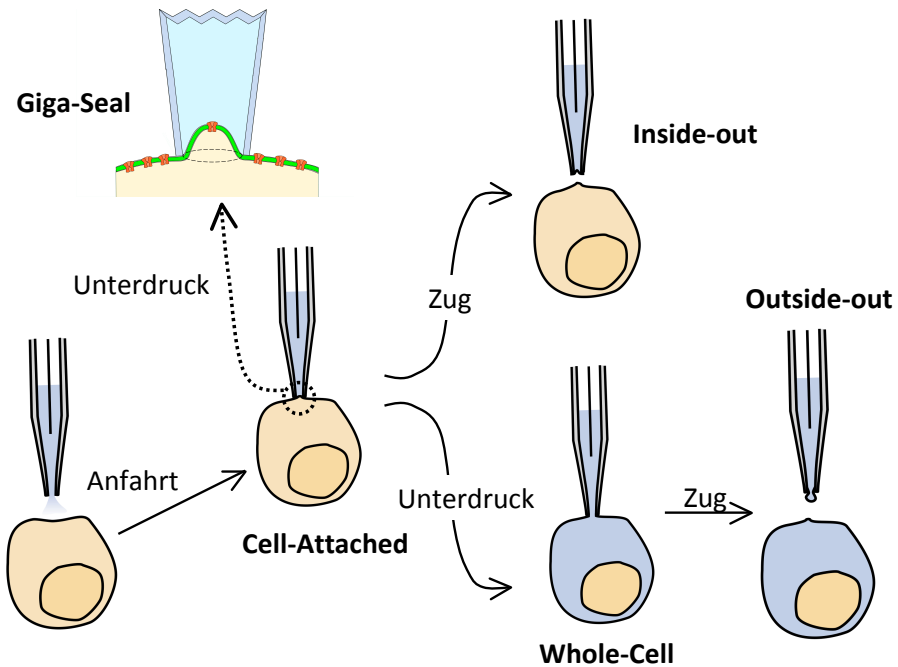


Abbildung 2.1 Darstellung der Patch-Clamp-Konfigurationen

Mit Hilfe des Mikromanipulators wird die Pipette der Zelle angenähert (Darstellung ganz links im Bild). Sobald die Pipette die Zellmembran fast berührt, nimmt man den vorher angelegten Überdruck von dem Inneren der Pipette weg. Dadurch lagert sich die lipophile Zellmembran dem Glas an und es kommt zur Ausbildung eines Giga-Seals (ggfs. kann man durch einen leichten Unterdruck nachhelfen). Aus dieser Cell-Attached-Konfiguration kann man folgende Messkonfigurationen erreichen: Durch einen kurzen, starken Unterdruck kann die Zellmembran in der Pipettenöffnung aufgerissen werden - man ist im Whole-Cell-Modus. Zieht man die Pipette aus dieser Position leicht zurück, reißt man einen Schlauch aus der Membran hinaus, der sich meist spontan zusammenlagern. Dabei lagert sich die Außenseite der Zellmembran vom Pipettenlumen weg - die Outside-out-Konfiguration ist erreicht. Lässt man in der Cell-Attached-Anordnung den Druck in der Pipette unverändert und zieht direkt die Pipette ein kleines Stück zurück, so wird ein Patch aus der Membran gerissen, dessen zytosolische Membranseite von der Pipette weg zeigt - die Inside-out-Konfiguration ist erreicht. Die Ausschnittsvergrößerung (oben links) zeigt die Dichte Verbindung zw. Pipettenspitze und Zellmembran - den Giga-Seal. Abbildungen adaptiert nach (Wikipedia-1 , Wikipedia-2)

Zusätzlich ist zu beachten, dass hier nur die Ströme durch alle Kanäle der Zellmembran kumulativ gemessen werden können und man nur schwer Einzelkanalströme auflösen kann.

Da für diese Arbeit ausschließlich Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt wurden, wird für Details über weitere technische Anwendungsmöglichkeiten auf die gängigen Fachbücher verwiesen (Numberger and Draguhn 1996). Alle Messungen dieser Arbeit wurden bei Raumtemperatur (ca. 25°C) durchgeführt.

2.3.3. *Aufbau des Patch-Clamp-Verstärkers*

Wie bereits erwähnt, war ein entscheidender Fortschritt der Patch-Clamp-Technik der Einsatz nur einer Messelektrode, die sowohl die Spannung über die Zellmembran messen, als auch den Kompensationsstrom in die Zelle injizieren konnte. Dies wird durch einen sogenannten Strom-Spannungs-Wandler ermöglicht (Abb. 2.2). Der Aufbau des komplexen Schaltkreises wird hier vereinfacht dargestellt.

Über den Computer und den Verstärker kann die Kommandospannung V_{soll} vorgegeben werden. Diese wird an einem Eingang des Operationsverstärkers (OPV) registriert. Am zweiten Eingang des OPV liegt die Potentialdifferenz zwischen der Messelektrode und der Badelektrode an. Diese Potentialdifferenz spiegelt die Membranspannung V_m wieder. Weicht diese Membranspannung von der Kommandospannung ab, so gibt der OPV an seinem Ausgang die Spannungsdifferenz (V_{aus}) vielfach proportional verstärkt ab [Gl.1: $V_{\text{aus}} = V_{\text{soll}} - V_m$].

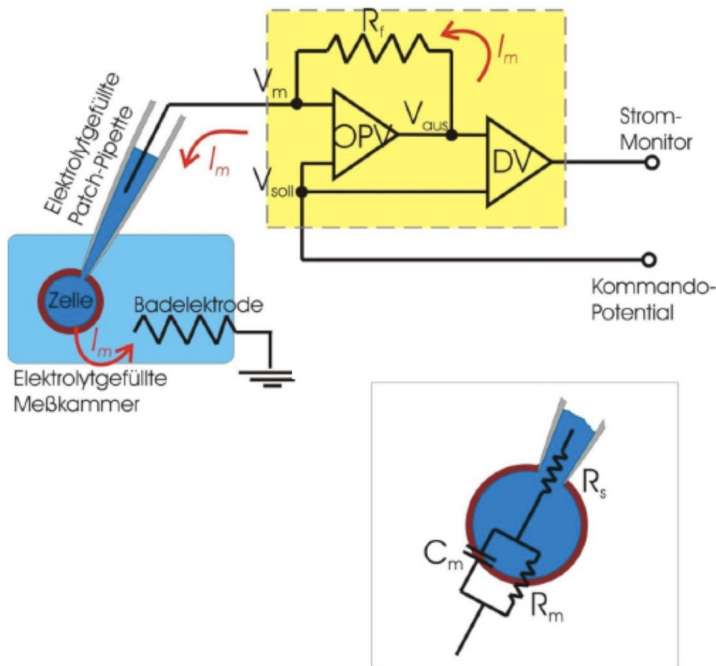


Abbildung 2.2 Schaubild zur Erläuterung des Strom-Spannungs-Wandlers

Die Bedeutung der dargestellten Komponenten wird im Text erläutert. Der obere Kasten repräsentiert den Strom-Spannungs-Wandler. Links ist eine Whole-Cell-Messung schematisch dargestellt. Unten rechts ist eine Vergrößerung dieser Messung gezeigt. Abbildung adaptiert aus dem Skript für das biophysikalische Praktikum ("Patch-Clamp-Verfahren") des Physikalischen Instituts der Universität Göttingen (P. Salonikidis, 2007).

Der Ausgang des OPVs besitzt zwei Verbindungen. Die erste Verbindung geht über einen Widerstand R_f zurück zur Messelektrode. Da die Spannungen V_m und V_{aus} voneinander abweichen, entsteht zwischen ihnen nach dem ohmschen Gesetz ein Strom (I_m) über R_f . Dabei ist zu beachten, dass der Strom nur in Richtung der

Messelektrode fließen kann, da an den Messeingängen des OPV ein als unendlich hoch anzunehmender Widerstand anliegt, der jeden Stromfluss in den OPV blockiert. Der Strom fließt also über die Messelektrode in die Zelle. Dort trifft er auf den Widerstand der Zellmembran (R_m) – er kann nur durch die geöffneten Ionenkanäle zur Badelektrode weiter fließen. Zum besseren Verständnis für spätere Erläuterungen über Einstellungen am Patch-Clamp-Stand sei an dieser Stelle schon erwähnt, dass eine Zellmembran nicht nur Ohm'sche (R_m) Eigenschaften besitzt, sondern auch kapazitive (C_m ; Abb. 2.2 - Detailbild unten rechts). Dies hat zur Folge, dass der inserierte Strom nicht einfach nur durch die Kanäle abfließen kann, sondern auch die gesamte Zellemembran umladen muss. Für das Verständnis des Strom-Spannungs-Wandlers ist von Bedeutung, dass der inserierte Strom (I_m) so lange über die Ionenkanäle fließt, bis sich die Membranspannung V_m der Kommandospannung V_{soll} angeglichen hat, denn dann ist die Spannungsdifferenz an den Eingängen des OPV und damit auch V_{aus} gleich null. Dieser Angleichungsprozess über den Rückkopplungsmechanismus des OPV verläuft kontinuierlich so schnell, dass man davon ausgehen kann, dass die Spannung der Zelle über die gesamte Zeit der Messung der Kommandospannung entspricht. Der inserierte Strom (I_m) ist also der Strom, den man benötigt, um die Membranspannung (V_m) der Kommandospannung (V_{soll}) anzugleichen. [V_m kann in Gl.1 durch den Stromfluss ersetzt werden – Gl.2: $V_{aus} = V_{soll} - I_m \times R_f$] Damit ist der Betrag des inserierten Stromes I_m identisch mit dem Betrag des Stroms, der natürlicherweise durch die Ionenkanäle der Zellmembran fließt und zur Abweichung der Spannung V_m von V_{soll} führen würde. In der Flussrichtung ist er ihm jedoch genau entgegengesetzt.

Der zweite Ausgang des OPV geht zum Differenzverstärker (DV). Dieser subtrahiert V_{soll} von V_{aus} und kann so unter Berücksichtigung von R_f den Stromfluss

I_m bestimmen. [Umformung von Gl.2: $-I_m = (V_{\text{aus}} - V_{\text{soll}}) / R_f$] Ein angeschlossener Analog/Digital-Wandler ermöglicht die Darstellung von I_m am Computer (Numberger and Draguhn 1996).

2.3.4. Details zu Einstellungen während der Messungen

Offset-Ausgleich

An den Übergängen zwischen den einzelnen Komponenten des Messstandes (Messelektrode-Pipettenlösung-Badlösung-Referenzelektrode) finden sich immer geringe Potentialunterschiede, die schon beim Eintauchen der Messelektrode in die Badlösung als Ströme sichtbar werden. Dies wird als Offset bezeichnet. Da auch diese Ströme das Messergebnis verfälschen, versucht man, so kurz wie möglich vor dem Kontakt mit der Zelle das Messgerät zu kalibrieren. In der Praxis wird die Pipette einige Mikrometer vor der Zelloberfläche angehalten und der Offset-Ausgleich des Pulse-Programms aktiviert. Dieser definiert mit Hilfe des Verstärkers das Potential, bei dem kein Strom fließt, als Nullpotential.

Liquid-Junction-Potential

Die Pipetten- und Badlösung enthalten unterschiedliche Konzentrationen an Ionen. Treten zwei verschiedene Elektrolytlösungen in direkten Kontakt, haben sie das Bestreben, sich anzugleichen. Der daraus resultierende Strom erzeugt ein Diffusionspotential, welches bei der Messung fälschlicherweise zu V_{soll} gerechnet wird. Dieses sogenannte Liquid-Junction-Potential wurde für die hier verwendeten Lösungen mit Hilfe des Computerprogrammes Clampex errechnet. Es lag bei 4,5 mV und wurde in allen Messungen von V_{soll} subtrahiert.

Serienwiderstand

Bereits die kleine Öffnung der Pipette bildet einen Ohmschen Widerstand zwischen Messelektrode und Zellinnerem bzw. dem zu messenden Patch. Dieser Widerstand kann bei der Herstellung der Pipetten durch eine unterschiedliche große Pipettenöffnung beeinflusst werden. Bei den Messungen für diese Arbeit lag der Pipettenwiderstand im Bereich von 2,5 - 5 M Ω .

Da man zum Aufreißen der Zellmembran für kurze Zeit einen starken Unterdruck anlegen muss, werden Membranfragmente und Bestandteile aus dem Zellinneren in die Pipette hinein gesogen. Diese verstopfen die Pipetten zusätzlich, sodass der reelle Widerstand zwischen der Messelektrode und dem Zellinneren höher angenommen werden muss. Dieser sogenannte Serienwiderstand (R_s in Abb. 2.2) führt zu folgenden Problemen: Der Kompensationsstrom, der zum Aufrechterhalten der Kommandospannung in die Zelle injiziert wird, wird durch den Widerstand abgeschwächt. Dadurch wird mehr Zeit benötigt, um die nötige Ladungsmenge in die Zelle zu bringen. Umgekehrt wird auch eine Spannungsänderung der Zelle langsamer von der Elektrode registriert. Beides zusammen führt dazu, dass die reelle Spannung über die Zellmembran von der Kommandospannung abweicht, ohne dass es registriert wird. Je größer der Serienwiderstand ist, desto stärker wird auch die Differenz zwischen Soll- und reeller Membranspannung, was die Messungen verfälscht. Das Pulse-Programm ermöglichte die Messung und eine automatische Kompensation des Serienwiderstandes, welche auf 70% der Kommandospannung und 100 μ s eingestellt war. Außerdem wurde für die Messungen kein Serienwiderstand über 15 M Ω akzeptiert.

Kapazitätskompensation

Wie in Absatz 2.3.3. erwähnt, hat die Zellmembran neben ihrer Eigenschaft als Ohm'scher Widerstand auch kapazitative Eigenschaften. Dies bedeutet, dass der zum Aufrechterhalten der Kommandospannung V_{soll} benötigt Strom I_m nicht einfach nur den Stromfluss durch die Ionenkanäle der Zellmembran ausgleichen, sondern bei jeder Spannungsänderung auch die Lipidmembran selbst umladen muss. Dieser Umladeprozess führt zu Strömen, die nicht den Stromfluss durch die Ionenkanäle widerspiegeln. Damit diese Ströme die Messung nicht verfälschen, kann mit Hilfe einer hier nicht dargestellten Erweiterung des Strom-Spannungswandlers eine sogenannte C-Kompensation durchgeführt werden. Dabei wird, vereinfacht gesagt, über einen getrennten Eingang ein den kapazitiven Strömen entgegen gesetzter Strom in die Pipette geleitet, der die kapazitiven Ströme aufhebt. Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, dass auch die Glaspipette über kapazitative Eigenschaften verfügt und auch diese auf gleiche Weise kompensiert werden können. Im Ablauf einer Patch-Clamp-Messung bedeutet dies, dass man direkt nach der Bildung eines Giga-seals und kurz nach dem Aufbrechen der Zellmembran für die Whole-Cell-Messung jeweils die C-Kompensation des Pulse-Programms aktiviert.

Die kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran sind für die Messung allerdings auch sehr hilfreich. Wie oben dargestellt, kann man den ersten Kontakt zwischen Glaspipette und Zellmembran und die darauf folgende Herstellung des Giga-Seals anhand der Veränderung des Teststromes am Computerbildschirm gut verfolgen. Möchte man nun die Whole-Cell-Konfiguration erreichen, muss man die Membran aufbrechen. In dem Moment, in dem gerade der Patch eröffnet wurde und nun nicht mehr nur der kleine Patch, sondern die gesamte Zellmembran geklemmt werden muss, werden sofort die größeren kapazitiven Ströme auf dem

Bildschirm sichtbar. Nun kann man beurteilen, wie gut der Zugriff auf die Zelle ist und ob der Seal weiterhin stabil bleibt. Zusätzlich kann das Computerprogramm anhand des C-Kompensationsprotokolls über die Membrankapazität die Größe der geklemmten Zelle errechnen und den Serienwiderstand R_s bestimmen.

2.3.5. Auswertung der Patch-Clamp-Messungen

Stromdichte-Werte

Der Stromfluss in Ein- und Auswärtsrichtung wurde kurz nach dem Erreichen der Ganzzellkonfiguration (Basalstrom), sowie auf dem höchsten Punkt der Aktivierung nach Applikation von OAG, CCh oder GTPyS bei Haltepotentialen von ± 60 mV abgelesen (vgl. Abb. 3.2 A).

Eine große Zelle verfügt über eine größere Fläche zum Einbau von Ionenkanälen und zeigt in einer Ganzzelleableitung deshalb meist auch einen größeren Ionenstrom als eine kleinere Zelle. Damit die unterschiedlich großen Zellen nicht zu Verzerrungen beim Vergleich verschiedener Messungen führen, wurde die Stromdichte [pA/pF] für Ein- und Ausströme errechnet. Diese setzt den Stromfluss (I in [pA]) bei einer vorgegebenen Membranspannung zu einem bestimmten Zeitpunkt der Messung in Relation zur Membrankapazität (C_m in [pF]). Diese hängt in einer Ganzzellmessung von der Größe der Zelle ab und kann während des Messvorgangs bestimmt werden (vgl. Kapitel 2.3.4.).

Strom-Spannungsbeziehung

In allen Messungen wurden Spannungsrampen mit einer Frequenz von 1 Hz appliziert. Dabei wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,4 V/s die Spannung von -100 mV auf +60 mV erhöht und wieder auf den Ausgangswert zurückgeführt (trianguläre Spannungsrampen). Die dabei entstandenen Änderungen im

Stromfluss wurden aufgezeichnet und ausgewertet (vgl. Abb. 2.3). Der Kurvenverlauf ist dabei ein charakteristisches Merkmal für verschiedene Ionenkanäle und kann somit zur Identifizierung des für den Ionenstrom verantwortlichen Kanals beitragen.

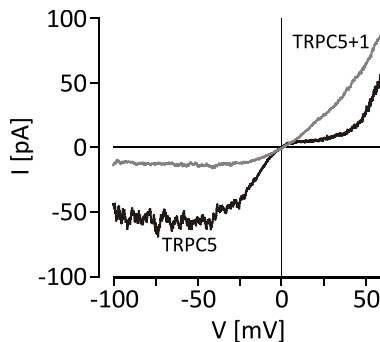


Abbildung 2.3 Stromspannungsbeziehung des TRPC5-Homomers und TRPC5-C1-Heteromers

Dargestellt ist die charakteristische Stromspannungsbeziehung (I-V) des TRPC5 (schwarz) und des Heteromers aus TRPC5 und TRPC1 (grau). Für die Darstellung der I-V wird in dieser Arbeit nur der aufsteigende Teil der eigentlich triangular applizierten Spannungsrampe verwendet.

2.3.6. Zusammensetzung der verwendeten Bad- und Pipetten-Lösungen

Die Badlösung enthielt folgende Bestandteile: 140 mM NaCl; 5 mM CsCl; 2 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 10 mM HEPES; 10 mM Glukose. Die Lösung wurde mit NaOH (1,11 N) auf einen pH von 7,4 titriert. Die Osmolarität lag zwischen 290-300 mOsmol.

Die Pipettenlösung enthielt folgende Bestandteile: 120 mM CsCl; 3,949 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 0,2 mM $\text{Na}_3\text{-GTP}$; 9,4 mM NaCl; 10 mM HEPES, 10 mM BAPTA. Die

Lösung wurde mit CsOH (5M) auf einen pH von 7,2 titriert und hatte eine Osmolarität von 290-300 mOsmol.

2.4. Molekularbiologie

2.4.1. Verwendete Kanal-, Rezeptor- und Fluoreszenzprotein-Plasmide

Für alle Messungen dieser Arbeit wurden TRPC-Kanäle mit den Basensequenzen der Maus verwendet. Im Folgenden findet sich eine Auflistung und Beschreibung der eingesetzten Kanäle, Rezeptoren und Fluoreszenzproteine zusammen mit den Bezeichnungen, die in dieser Arbeit verwendet werden.

<i>Kanal/Rezeptor/Fluoreszenzprotein</i>	<i>Bezeichnung</i>
TRPC3 (Mio et al. 2007) in pCI-Neo	TRPC3
TRPC5 (Schaefer et al. 2000) in pcDNA3.1	TRPC5
TRPC5 (Schaefer et al. 2000) in pIRES2-EGFP	TRPC5-IRES
und daraus die folgenden drei Klone (Zhu et al. 2005)	
TRPC5: Austausch Serin zu Alanin an Position 666	TRPC5-S666A
TRPC5: Austausch Serin zu Alanin an Position 752	TRPC5-S752A
TRPC5: Austausch Threonin zu Alanin an Position 972	TRPC5-T972A
TRPC6 (Storch et al. 2012) in pIRES2-EGFP	TRPC6
Muskarinischer Acetylcholinrezeptor	M5R
EGFP (Clontech, Palo Alto, USA) in pcDNA3.1	EGFP

Der Vektor pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, USA) kodierte selbst für ein Fluoreszenzprotein. Wurden die Vektoren pCI-Neo (Promega, Madison, USA) oder pcDNA3.1 (Invitrogen, Darmstadt) verwendet wurde 0,1 µg EGFP kotransfiziert.

2.4.2. Amplifikation der Plasmide

Verwendete Lösungen

Für das flüssige LB-Medium wurden auf 1 l doppelt-destilliertes Wasser (ddH₂O) 10 g NaCl, 10 g Pepton und 5 g Hefeextrakt vermischt. Mit NaOH wurde ein pH von 7 eingestellt und im Anschluss daran die Lösung autoklaviert. Kurz vor der Verwendung zur Bakterienanzucht wurde dem Medium je nach Resistenz (vgl. die jeweiligen Produktbeschreibungen) des verwendeten Vektors 100 µg/ml Ampicillin (z.B. pcDNA3.1) bzw. 50 µg/ml Kanamycin (z.B. pIRES2-EGFP) beigemischt. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde der Lösung vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar beigemischt. Das jeweilige Antibiotikum wurde (in denselben Konzentrationen) nach dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf ca. 55°C hinzugefügt und im Anschluss daran jeweils ca. 20 ml des Mediums auf 92 mm Petrischalen verteilt.

Transformation

Im ersten Schritt der Amplifikation wurde die Plasmid-DNA in CaCl₂-kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert, welche freundlicherweise von Herrn Dr. med. Thomas Hofmann bereit gestellt wurden.

Ein 100 µl Aliquot der Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und dann mit mindestens 5 ng des zu amplifizierenden Plasmids versetzt. Die Bakterien blieben für weitere 30 Minuten auf Eis, wurden dann für 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad getaucht und umgehend wieder auf Eis gekühlt. Nach 2 Minuten wurden 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum; 37°C) dazugegeben und der Ansatz bei 37°C im Thermomixer für mindestens eine Stunde leicht geschüttelt. Die Bakterien wurden

anschließend auf Antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und für ca. 12-16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Präparation

Die Bakterien, die das Plasmid und damit auch die darauf kodierte Resistenz aufgenommen hatten, konnten auf der Antibiotikahaltigen Agar-Platte zu Kolonien heranwachsen. Diese wurden mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen gepickt und in einen 200 ml LB-Medium (mit Selektionsmittel) enthaltenden Erlenmeyerkolben überführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit (> 12 Stunden bei 37°C) und einer zu beobachtenden Trübung des LB-Mediums wurde das Plasmid mit Hilfe eines Midi-Kits (*Marchery-Nagel*, Düren) über eine Affinitätssäule nach den Arbeitsvorgaben des Herstellers aufgereinigt. Die Reinheit und der Gehalt der Präparation wurden photometrisch bestimmt.

Handelte es sich bei den Plasmiden um neu synthetisierte Klone von Kanälen oder siRNAs wurde zwischen die beiden Schritte der Transformation und der Amplifikation im Midi-Präp ein Mini-Präp (*PEQLAB Biotechnologie*, Erlangen) durchgeführt. Dazu wurden die gepickten Klone in nur 5 ml LB-Medium (mit Selektionsmittel) bei 37°C über Nacht inkubiert und ein Teil der Menge nach den Vorgaben des Herstellers mittels einer Affinitätssäule aufgearbeitet. Die Integrität der Plasmide wurde anschließend mittels eines *HindIII*-Verdau und einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. 1 µg der Plasmid-DNA wurde an die Firma *MWG* (Ebersberg) zum Sequenzieren verschickt. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde die übriggebliebene Menge an Bakterien in 200 ml LB-Medium überführt, inkubiert und dann in einer Midi-Präp wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Mutagenese

Die drei oben erwähnten Klone des TRPC5 wurden freundlicherweise von Frau Eva Braun hergestellt. Die benötigten Primer für die Punktmutationen wurden mit Hilfe des Programms der Firma *DNASTAR* (Madison, USA) geplant. Die Synthese der Primer wurde bei der Firma *Metabion* (Martinsried) in Auftrag gegeben. Die eigentliche Mutagenese wurde mit Hilfe des Kits der Firma *Agilent Technologies* (Waldbronn) durchgeführt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zum Schluß, wie oben beschrieben, mit Hilfe des Midi-Kits amplifiziert und bei der Firma *MWG* (Ebersberg) sequenziert.

2.4.3. Grundlagen zu RNA interference (RNAi)

Elbashir (2001) und Caplen (2001) waren die ersten, die mittels synthetisch hergestellter RNA-Moleküle (*small interfering* RNA; siRNA) gezielt die Translation verschiedener Genabschnitte in funktionstüchtige Proteine verhindern konnten. Die Tatsache, dass kleine RNA-Fragmente (21-23 Nukleotide) an *messenger* RNA (mRNA) binden und deren Zerstückelung einleiten können, war bereits bekannt (Fire et al. 1998). Auf diese Weise können sich z.B. Pflanzen- und Säugerzellen gegen ein Virus wehren, indem sie Spaltprodukte der replizierten Virus-RNA nehmen, um diese fremde RNA zu erkennen und zu zerstören (Haasnoot, Westerhout, and Berkhout 2007).

Für die Forschung ist das Prinzip der RNA *interference* interessant, da durch die gezielte Unterdrückung eines Genprodukts dessen Bedeutung für die Zelle, aber auch für den Gesamtorganismus, untersucht werden kann. Zusätzlich ist der Einsatz von siRNAs als Pharmakon ein wichtiges Forschungsfeld in der Immunologie, Onkologie und anderen medizinischen Bereichen (Whitehead, Langer, and Anderson 2009).

Wie eine siRNA auf Zellebene funktioniert, wird in der Abb. 2.3 erläutert.

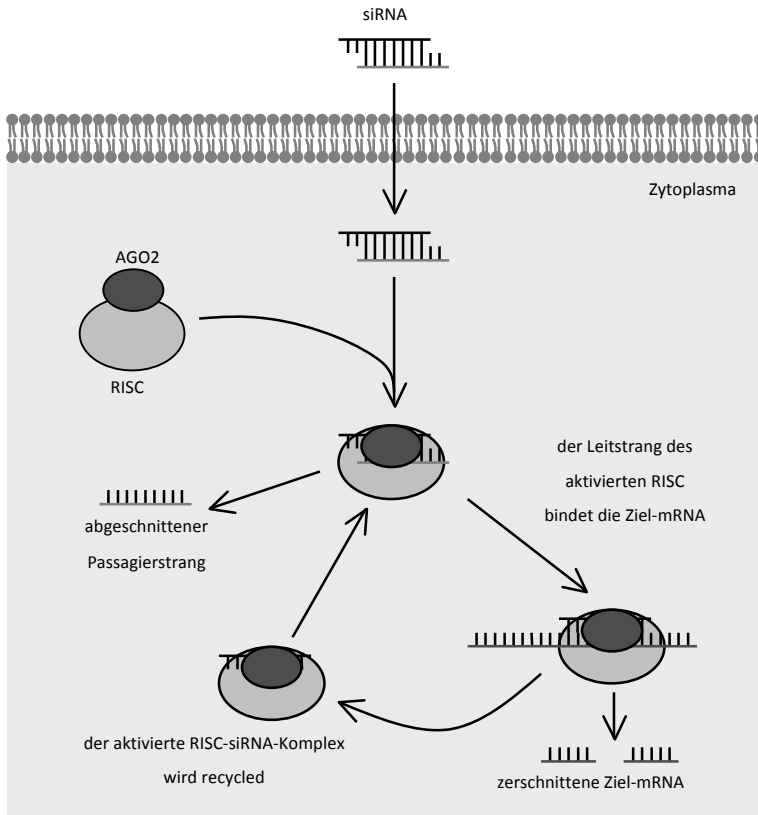


Abbildung 2.3 Funktionsprinzip der siRNA

Die mit Hilfe eines Vektors in die Zelle eingeschleuste siRNA wird vom RNA-induced silencing complex (RISC) aufgenommen. Das Protein Argonaute 2 (AGO2) trennt die siRNA auf und schneidet den Sinnstrang (auch Passagierstrang) der siRNA ab. Der so aktivierte RISC-Komplex kann nun durch den Matrizenstrang komplementäre mRNA erkennen und in Fragmente zerlegen. Auf diese Weise wird eine Translation der mRNA in funktionstüchtige Proteine verhindert. Nach (Whitehead, Langer, and Anderson 2009)

2.4.4. siRNA-Sequenzen

Die siRNAs gegen den TRPC5 wurden für diese Arbeit neu berechnet und hergestellt. Alle anderen siRNAs wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Hermann Kalwa zur Verfügung gestellt (Kalwa 2009).

Bezeichnung	Ziel-Sequenz: (sense-antisense orientation) 19 bp
aTRPC1	5'-TGAACCTAGTGCTGATTTA-TAAATCAGCACTAAGTTCA-3'
aTRPC3	5'-GAGCCAAGCAACTGAGGAA-TTCCTCAGTTGCTTGGCTC-3'
aTRPC4	5'-GGACACGGTTCCTATAATA-TATTATAGGAACCGTGTCC-3'
aTRPC5	5'-ATCAAATATCACCAGAAAG-CTTCTGGTGATATTTGAT-3'
aTRPC6	5'-TCGAGGACCAGCATACATG-CATGTATGCTGGTCCTCGA-3'

Die siRNAs aTRPC3 und aTRPC3+7 waren in den Vektor pSuper (*Oligoengine*, Seattle, USA) eingebaut und enthielten keine Kodierung für ein Fluoreszenzprotein. Sie wurden deshalb mit 0,1 µg EGFP kotransfiziert. Die restlichen siRNAs waren in den Vektor pSuper.neo-GFP (*Oligoengine*, Seattle, USA) integriert. Für die siRNA gegen den TRPC6 wurde zusätzlich eine stabile, virale Transfektion in HT22-Zellen mit dem Plasmid psPAX2 (*Addgene*, Boston) hergestellt.

2.4.5. Design der siRNA Sequenzen

Die siRNA-Sequenzen wurden gemäß der von Elbashir (Elbashir et al. 2002) vorgeschlagenen und durch die von Reynolds (Khvorova, Reynolds, and Jayasena 2003) erweiterten Regel ermittelt. Als Hilfe diente das von Maurice Ho generierte

Excel Makro: <http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>, sowie eine Strukturanalyse potentiell maskierter Abschnitte mittels Sfold: <http://sfold.wadsworth.org/>
Die Ermittlung der Sequenzen für die beiden siRNAs gegen den TRPC5 übernahm freundlicherweise Frau Dr. rer. nat. Ursula Storch.

2.4.6. Einbau der siRNA Oligos in den Vektor pSuper.neo.GFP

Die einzelnen Schritte zur Herstellung einer siRNA im pSuper.neo.GFP-Vektor können im Manual der Firma *OligoEngine* (Seattle, USA) nachgelesen werden. Die Abläufe wurden nach der Beratung durch Dr. Hermann Kalwa modifiziert, weshalb sie an dieser Stelle kurz dargestellt werden. Alle verwendeten Enzyme und Reagenzien wurden von der Firma *Fermentas* (St. Leon-Rot) bezogen.

Verdau des pSuper.neo.GFP-Vektors

5 µg des Vektors wurden mit dem klassischen Verfahren durch Bgl-II und HindIII nach den Angaben des Herstellers über Nacht verdaut, anschließend mit 1 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) vermischt und für 30 Minuten bei 37°C und 10 Min. bei 70°C inkubiert. Das Produkt wurde über ein 2%iges Agarosegel aufgereinigt und durch ein DNA-Geextraktionskit nach den Standardvorschriften der Herstellerfirma aus dem Gel gelöst.

Annealing der Oligonukleotide

Es wurde die doppelte Menge (2 µl) an Oligos (forward und reverse) mit nur 46 µl des "annealing buffers" (verwendete Zusammensetzung: 100 mM Kaliumacetat; 30 mM HEPES-KOH pH 7,4; 2 mM Mg-Acetat) gemischt. Die Mixtur wurde in 0,5 ml Cups überführt, in Frischhalte- und Alufolie eingepackt und anschließend in 0,5 l kochendes Wasser gelegt. Nach zwei Minuten wurde die Heizplatte abgeschaltet und die Cups wieder entnommen, sobald das Wasser Handwärme erreicht hatte.

Dies ermöglichte die linearste Abkühlung, die selbst mit einer PCR-Maschine nicht optimal einzustellen war.

Phosphorylierung der Oligonukleotide

Folgende Reagenzien wurden in einem 100 µl PCR-Cup gemischt: 2 µl der vorbereiteten Oligonukleotide; 1 µl Polinukleotid-Kinase (PNK); 1 µl PNK-Puffer; 1 µl ATP (1 mM); 5 µl ddH₂O. Diese Mischung wurde für 30 Minuten bei 37°C und weitere 10 Minuten bei 70°C in einer PCR-Maschine inkubiert.

Ligation in den pSuper-Vektor

Zur Ligation der phosphorylierten Oligonukleotide in den verdauten Vektor wurden 2 µl der Oligos, 1 µl Ligase, 1 µl Ligase-Puffer, 1 µl Vektor, 1 µl ATP (1 mM) und 4 µl H₂O für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Amplifikation und Sequenzierung

Der gesamte Ansatz wurde in Bakterien transformiert und als Mini-Präparation amplifiziert wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben. Parallel zur Amplifikation in den Bakterien wurde eine Erfolgskontrolle durch klassische PCR mit den T3- und T7-Primern (*Fermentas*; St. Leon-Rot) durchgeführt. Dabei wurden die Pipettenspitzen nach dem Picken der Klone von den Agarplatten (4 Klone pro Platte) kurz in einen vorbereiteten Mastermix für die PCR getaucht. Die Zusammensetzung dieses Mastermixes war wie folgt gewählt: 0,2 µl T3-Primer; 0,2 µl T7-Primer (beide unverdünnt); 0,2 µl Taq-Polymerase; 0,4 µl dNTPs; 2,5 µl PCR-Buffer P-2192 der Firma *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen); 21,5 µl H₂O. Die PCR wurde in folgenden Schritten durchgeführt: 94°C für 5 min, anschließend 45 Zyklen lang für je 30 Sekunden 94°C, 60°C, 72°C und zum Ende 72°C für 10

Minuten. Als Positivkontrolle wurde der Leervektor und eine bereits vorhandene siRNA im selben Vektor genommen. Die Produkte der PCR wurden in einem 2%igen Agarosegel (2 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8 mit konzentrierter Essigsäure [40 mM] und 7 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt und von denjenigen mit erfolgversprechenden Banden entsprechende Proben aus der Mini-Präp zur Sequenzierung an MWG (Ebersberg) geschickt. Die Sequenzierung erfolgte ebenso mit den Standardprimern T3 und T7. Nach einem positiven Ergebnis erfolgte die Amplifikation mittels einer Midi-Präparation (Kapitel 2.4.2.)

2.4.7. *PepTag[®] Assay: nicht-radioaktive Messung der Aktivität der PKC*

Die Etablierung dieses Assays wurde anhand des technischen Bulletins der Firma Promega versucht. Da auch nach mehrfach wiederholten Durchläufen kein Ergebnis zu erzielen war, wurden mit der Unterstützung von Frau Marga Losekam und des technischen Dienstes der Firma Promega verschiedene Variationen der Aufarbeitung erarbeitet - leider ohne Erfolg. Da aber die Bestimmung der Aktivität der Proteinkinase C (PKC) ein entscheidender Schritt in dieser Arbeit sein sollte, wird an dieser Stelle kurz vorgestellt, nach welchem Prinzip dieser Assay funktionieren sollte.

Funktionsprinzip des PepTag[®] Assays

Die Besonderheit dieses Assays ist die Entwicklung eines Peptids (Aminosäuresequenz: P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K), das hochspezifisch für die Phosphorylierung durch die PKC ist. Zusätzlich ist dem Peptid ein Farbstoffmolekül angefügt worden, welches zur einer grell pinken Fluoreszenz führt.

In mehreren Schritten wurden zunächst die Proteine von ungefähr sieben Millionen HEK293-Zellen aufgearbeitet. Diesem Lysat wurde das Peptid beigemischt, welches nach der Phosphorylierung durch die PKC seine Nettoladung von +1 auf -1 änderte. Auf diese Weise wurde die Auftrennung der phosphorylierten von den nicht-phosphorylierten Peptiden mit Hilfe der Gelelektrophorese ermöglicht. Die Banden konnten nun unter einem UV-Licht sichtbar gemacht (vgl Abb. 2.4) und nach einer Gelextraktion die genauen Mengen der Peptide mittels Photometrie oder Spektrometrie gemessen werden.

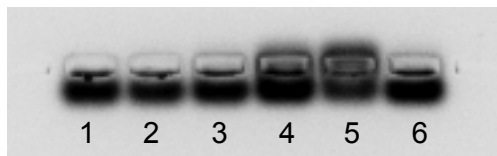


Abbildung 2.4 Verdünnungsreihe der mitgelieferten PKC des PepTag® Assays

Ab einer PKC-Konzentration von 20 ng (Tasche 5) ist die Aktivität der PKC stark genug, um das Peptid sichtbar aufzutrennen. (Tasche 1: Leerprobe; 2: 1,25ng; 3: 5ng; 4: 10ng; 5: 20ng; 6: 2,5ng)

Durchführung des PepTag® Assays nach dem Protokoll von Promega

Die erfolgreich transfizierten Zellen (Kontrolle via Fluoreszenzmikroskopie) wurden mit PBS gewaschen, mit 0,5 ml Extraktionspuffer übergossen, vom Boden der Kulturschale abgeschabt und homogenisiert (Zusammensetzung des PKC-Extraktionspuffer: 25 mM Tris-HCL (pH 7,4); 0,5 mM EDTA; 0,5 mM EGTA, 0,05% Triton® X-100; 10 mM β -mercaptoethanol; 1 μ g/ml Leupeptin; 1 μ g/ml Aprotinin; 0,5 ml/dl PMSF). Das Lysat wurde für 5 Minuten bei 14,000 g abzentrifugiert und der Überstand auf eine 1 ml DEAE-Zellulose-Säule gegeben. Die DEAE-Zellulose war zuvor im Extraktionspuffer vorequilibriert, wiederholt mit dem Puffer

gewaschen und anschließend in eine vertikale Chromatographie-Säule überführt worden. Nachdem das Lysat vollständig auf die Säule geladen war, wurde diese mit 5 ml PKC-Extraktionspuffer gewaschen und anschließend die PKC mit 5 ml des PKC-Extraktionspuffers, der zusätzlich 200 mM NaCl enthielt, eluiert.

Für die Phosphorylierung des PepTag[®] Peptids wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt (alle Komponenten bis auf das ddH₂O wurden von Promega mitgeliefert, die Zusammensetzungen können dem Manuel der Firma entnommen werden): je 5 µl PepTag[®] PKC Reaktionspuffer, PepTag[®] C1 Peptide und PKC 5fach Aktivator-Lösung (ultraschallbehandelt) wurden mit 1 µl Peptid stabilisierender Lösung vermischt. Diese Lösung wurde für 2 Minuten bei 30°C inkubiert, um anschließend 4-9 µl des aufgereinigten Lysats hinzuzufügen. Eine positive und negative Kontrolle mit 4 µl aufgereinigter PKC der Ratte (von Promega mitgeliefert) bzw. 9 µl ddH₂O wurden parallel angesetzt. Die Reaktionsansätze wurden, wenn nötig, mit ddH₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt und schließlich für 30 Minuten bei 30°C auf einen Heizblock gestellt. Die Reaktion wurde zum Schluss für 10 Minuten bei 95°C gestoppt.

Nun konnten die phosphorylierten von den nicht-phosphorylierten Peptiden in einem Agarose-Gel mit Tris-HCl-Puffer (50 mM Tris; pH 8,0) durch anlegen einer 100 V Spannung aufgetrennt werden. Unter UV-Licht wurden die Banden photographisch dokumentiert und in einigen Fällen die Peptide durch die mitgelieferte Gel-Extraktion gelöst und die Konzentration spektrometrisch bestimmt. Das Exzitationsmaximum des Peptids liegt bei 568 nm, das Emissionsmaximum bei 592 nm.

3. ERGEBNISSE

3.1. DAG-Sensitivität des TRPC5

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.5.) bereits beschrieben, gelten TRPC2, 3, 6 und 7 als rezeptorgesteuert und sensibel für DAG. TRPC4 und 5 werden ebenfalls als rezeptorgesteuert angesehen, zeigen aber bisher in fast allen Studien keine Sensitivität für DAG oder sein membrangängiges Analogon OAG (Zholos 2014). Einzig Lee et al. (2003) konnten in Zellen des Magens der Maus einen durch OAG aktivierbaren Kationenstrom nachweisen, wobei sie aufgrund der elektrophysiologischen Eigenschaften des untersuchten Ionenkanals davon ausgingen, dass der TRPC5 für den Ionenstrom verantwortlich war. Ebenso war in dieser Studie der TRPC5 in HEK293-Zellen durch OAG aktivierbar.

Unsere Arbeitsgruppe konnte den in HEK293-Zellen überexprimierten TRPC5 nicht durch OAG aktivieren, was die bisher überwiegende Studienlage ergänzt (vgl. Abb. 3.1 A+B). Wurde jedoch zusätzlich zum TRPC5 ein G_q - oder G_i -koppelnder Rezeptor (z.B. rM_5R , vgl. Abb. 3.1 C) koexprimiert, so wurde der Kanal für endogene DAG-Akkumulation oder OAG sensibel. Diese Beobachtungen konnten in verschiedenen heterologen Expressionsmodellen und durch verschiedene Techniken bestätigt werden (Ren 2007). Auch eine Inhibition der PKC-Aktivität mittels BIM-I (vgl. Abb. 3.1 D) und Staurosporin führte zu einer OAG-Sensitivität des TRPC5, während dies in parallelen Kontrollmessungen nicht der Fall war (vgl. Abb. 3.1 B).

Dabei zeigte sich sowohl nach Rezeptorstimulation durch Carbachol (CCh) als auch nach OAG-Applikation die charakteristische Strom-Spannungsbeziehung (I-V) des

TRPC5 (Abb. 3.1 C): Im negativen Spannungsbereich findet zunächst ein Einstrom von Kationen zwischen 0 und -30 mV statt. Bei negativeren Spannungswerten nimmt die Leitfähigkeit für Kationen ab, wobei sich an dieser Stelle ein für den TRPC5 typisches Rauschen darstellt. Das Umkehrpotential liegt bei etwa 0 mV, bei positiven Spannungswerten folgt diesem ein Sattel, der bis etwa 30 mV anhält, während sich danach ein ansteigender Auswärtsstrom von Kationen zeigt (Plant and Schaefer 2005).

Die in Abbildung 3.1 zusammengefassten Beobachtungen führten zu der Annahme, dass eine Phosphorylierung des TRPC5 durch die Proteinkinase C zu einer Insensitivität dieses Kanals gegenüber DAG und seinem Analogon OAG führt. Die Koexpression eines G_q - oder G_i -koppelnden Rezeptors könnte möglicherweise zu einer verminderten Aktivität der PKC führen und somit ebenfalls für eine Aktivierbarkeit des TRPC5 durch DAG führen. Zur Überprüfung dieser Hypothesen sollten für die diese Arbeit Mutationen von 3 möglichen Phosphorylierungsstellen des TRPC5 durch die PKC auf ihre OAG-Sensitivität hin untersucht werden (Kapitel 3.2.). Zudem sollte die Aktivität der PKC in HEK293-Zellen bei einer alleinigen Expression des TRPC5 mit einer Co-Expression mit einem G_q -koppelnden Rezeptor verglichen werden (Kapitel 5.4.). Zuletzt wurde ein homologes Zellmodell für den TRPC5 gesucht, in welchem sich die Befunde überprüfen lassen (Kapitel 3.3.-3.5.).

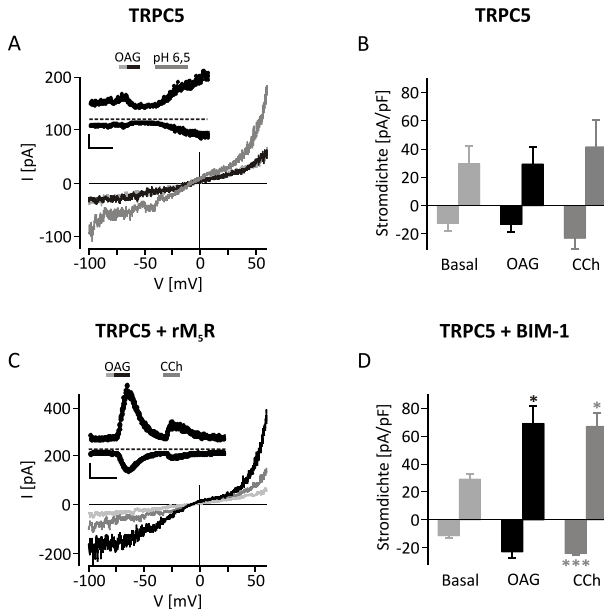


Abbildung 3.1 OAG-Sensitivität des TRPC5

A+C Exemplarische konventionelle Ganzzellableitungen in HEK293-Zellen. Großer Graph: I-Vs; kleiner Graph: Strom-Zeit-Verläufe bei einem Haltepotential von ± 60 mV. Die gestrichelte Linie stellt das Nullstromniveau dar, Skalierung 100 s/50 pA (A), 100 s/100 pA (C). Die Balken stehen für die Applikationsdauer der jeweiligen Badlösungen. Farbcode: schwarz – OAG (100 μ M), hellgrau – Kontrolllösung (DMSO und BSA jeweils 0,1%), dunkelgrau – Badlösung mit pH 6,5 (A) bzw. CCh (100 μ M; B). Transfektion: (A) TRPC5-IRES, (C) TRPC5-IRES + rM₅R. **B+D** Balkendiagramme mit den Stromdichte-Werten aus 4 Messungen von HEK-293-Zellen mit TRPC5-IRES transfiziert. D: PKC-Inhibition mit BIM-I (500 nM), Inkubation für 5 Minuten. Aktivierung mit je 100 μ M OAG und CCh. Angabe der Signifikanzen nach dem unabhängigen t-Test. Die hier gezeigten Daten und Abbildungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Ursula Storch bereitgestellt.

3.2. OAG-Sensitivität der TRPC5-Mutanten

Durch eine Hemmung der PKC wurde der TRPC5 durch OAG aktivierbar (vgl. Kapitel 1.7. und 3.1.). Um dieses Phänomen weiter zu überprüfen, wurden Punktmutationen an den von Zhu et al. (2005) beschriebenen potentiellen Phosphorylierungsstellen des TRPC5 S666, S752 und T972 durchgeführt. Dabei wurden Serin und Threonin jeweils durch ein Alanin ersetzt und die mutierten Kanäle auf ihre Aktivierbarkeit durch Carbachol (CCh) und OAG hin untersucht.

Die Mutanten wurden ohne die Co-Transfektion eines Rezeptors in HEK293-Zellen überexprimiert, da Überexpression von G_q - oder G_i -koppelnden Rezeptoren selbst zu einer DAG/OAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 geführt hatte (Ren 2007). Für eine Kontrolle der Aktivierbarkeit wurde CCh eingesetzt, wobei die Weiterleitung des CCh-Signals auf den endogen in HEK293-Zellen exprimierten Rezeptoren beruhte.

Die Mutante TRPC5-T972A war die einzige, die sich sowohl indirekt über die Stimulation des endogenen Muskarin-Rezeptors mittels 100 μ M CCh, als auch direkt über das membrangängige DAG-Analogon OAG (100 μ M) aktivieren ließ. Dabei zeigte sich die charakteristische I-V des TRPC5 (vgl. Abb. 3.2 B).

Um die Aktivierung der Mutante durch CCh und OAG zu quantifizieren und vergleichbar zu machen, wurden die Stromdichte-Werte für Ein- und Ausstrom von Kationen berechnet (vgl. Kapitel 2.3.5.). Insgesamt wurden für die Aktivierung durch OAG 13 und für CCh 11 Messungen ausgewertet. Die Angabe zum Signifikanzniveau der Aktivierungen gegenüber dem Basalstrom wird in den Balkendiagrammen der Abbildungen wiedergegeben. Dabei entspricht * einem p-Wert $<0,05$; ** $<0,01$ und *** $<0,001$. Die CCh- bzw. OAG-Aktivierung zeigten keine signifikante Abweichung voneinander (p-Werte deutlich $>0,05$). Ein

bemerkenswerter Unterschied lag allerdings in der Dauer der Aktivierung (vgl. Abb. 3.2 A). Die Aktivierung durch OAG ließ meist noch während der Applikation nach, während die Kanalaktivierung durch CCh nach dem Auswaschen des Agonisten persistierte. Eine Quantifizierung dieses Unterschieds ist hier jedoch nicht eindeutig möglich, da zum Einen die Applikation beider Agonisten nicht vergleichbar durchgeführt wurde (z.B. wurde CCh immer im Anschluss an OAG appliziert) und zum anderen kein definierter Endpunkt der Aktivierung festgelegt werden kann, da oftmals die CCh-Aktivierung durch erneute Applikation von OAG oder durch das Beenden der Messung unterbrochen wurde.

Die Mutante TRPC5-S752A ließ sich bei einer alleinigen Überexpression in HEK293-Zellen weder durch OAG, noch durch CCh aktivieren (Daten nicht dargestellt). Bei einer Co-Transfektion mit dem muskarinergen Rezeptor rM₅R zeigte sich schließlich ein durch CCh in der Badlösung aktivierbarer signifikanter Kationenstrom. Zusätzlich zeigten sich deutliche Ionenströme wenn 500 µM GTPγS (*engl. Guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate*), ein Aktivator von G-Proteinen, der den TRPC5 bekannter Maßen sehr gut aktiviert (Schaefer et al. 2000), eingesetzt wurde. Die I-V dieses Stroms zeigte in beiden Fällen das für den TRPC5 typische Bild. Eine Applikation von OAG führte weiterhin zu keiner Aktivierung des Kanals (vgl. Abb. 3.3).

Die Mutante TRPC5-S666A war bei einer alleinigen Überexpression ebenfalls weder durch CCh, noch durch OAG aktivierbar (vgl. Abb 3.4. A + B). Erstaunlicherweise war sie auch bei einer Co-Transfektion mit dem Rezeptor rM₅R weder durch CCh oder OAG (Daten nicht dargestellt), noch durch GTPγS aktivierbar (vgl. Abb. 3.4 C+D).

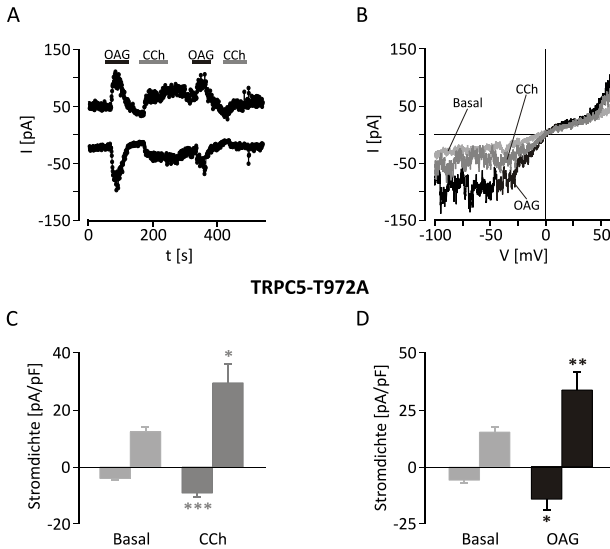


Abbildung 3.2 Aktivierung des TRPC5-T972A mit CCh und OAG

A Der Graph zeigt einen charakteristischen Strom-Zeit-Verlauf der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV. Die Balken stehen für die Applikationsdauer der Agonisten: Dunkelgrau - CCh (100 μ M), schwarz - OAG (100 μ M). Der Graph **B** zeigt die Strom-Spannungsbeziehung einer exemplarischen konventionellen Ganzzelleableitung von HEK293-Zellen, transfiziert mit TRPC5-T972A. Hellgrau: Basalstrom; Dunkelgrau: Aktivierung durch CCh (100 μ M); Schwarz: Aktivierung durch OAG (100 μ M) **C&D** Die Balkendiagramme zeigen die Zusammenfassung der Stromdichten aus 11 (C) bzw. 13 (D) Messungen und 7 unabhängigen Transfektionen. In zwei Messungen konnte die Badlösung mit Carbachol nicht mehr eingewaschen werden. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

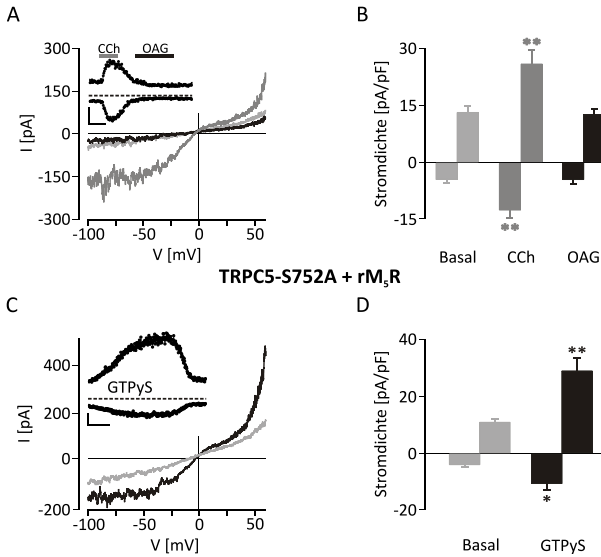


Abbildung 3.3 Aktivierung des TRPC5-S752A mit CCh und GTPyS

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen in HEK293-Zellen nach Transfektion mit TRPC5-S752A und rM₅R. Farbkodierung - A+B: schwarz steht für die Applikation von OAG (100 μ M), dunkelgrau - CCh (100 μ M), hellgrau - Basalstrom; C+D: schwarz - GTPyS (500 μ M), hellgrau - Basalstrom. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; die Balken stehen für die Applikationsdauer der Agonisten; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 7 (B) bzw. 6 Messungen (D) und 3 unabhängigen Transfektionen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

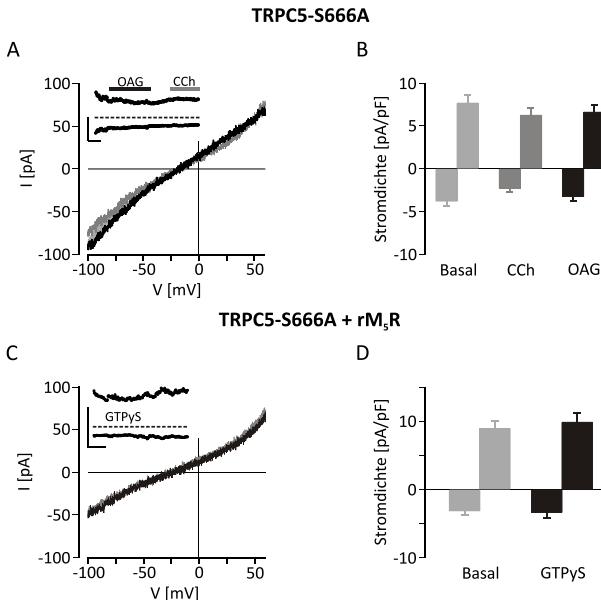


Abbildung 3.4 Messung des TRPC5-S666A mit CCh, OAG und GTPyS

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen in HEK293-Zellen nach Transfektion mit TRPC5-S666A (A+B) und einer Co-Transfektion des Kanals mit dem Rezeptor rM₅R (C+D). Farbkodierung - A+B: schwarz steht für die Applikation von OAG (100 μ M), dunkelgrau - CCh (100 μ M), hellgrau - Basalstrom; C+D: schwarz - GTPyS (500 μ M), hellgrau - Basalstrom. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; die Balken stehen für die Applikationsdauer der Agonisten; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus je 6 Messungen und 5 unabhängigen Transfektionen. Es zeigten sich in den t-Tests für paarweise Stichproben keine signifikanten Unterschiede.

3.3. Testung verschiedener Agonisten an HT22-Zellen

Die bisherigen Beobachtungen zur Frage der DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 in Abhängigkeit von der PKC-Aktivität waren alle in Zellmodellen mit einer Überexpression des Kanals gemacht worden. Aufgrund ihrer Herkunft von murinen hippocampalen Neuronen und der hohen Expression an mRNA des TRPC5 (vgl. Kapitel 1.4. und 1.8.) war die HT22-Zelllinie ein guter Kandidat für die Untersuchung eines nativen TRPC5-Stroms. Zum einen sollte in dieser Zelllinie untersucht werden, ob sich mit verschiedenen Agonisten ein Kationenstrom beobachten lässt. Zum anderen sollte geprüft werden, ob ein solcher Strom durch siRNAs, welche gegen TRPC-Kanäle gerichtet sind, unterdrückt werden kann. Wie in Kapitel 2.4.3. erläutert, können sich siRNAs sehr spezifisch mRNA-Molekülen anlagern und deren Translation in ein Protein verhindern. Im Falle der Unterdrückung eines Ionenstroms durch eine bestimmte siRNA kann somit die Beteiligung des betreffenden Proteins am Aufbau des entsprechenden Ionenkanals angenommen werden.

3.3.1. Einsatz von Chlorid-Kanal-Blockern

In den ersten mit HT22-Zellen durchgeführten Patch-Clamp-Messungen zeigte sich gleich zu Beginn ein spontaner Ionenstrom (oft >1 nA), welcher durch die einmalige Gabe von 50 μ M NPPB (*engl. 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic Acid*), einem Chlorid-Kanal-Blocker, hemmbar war. Ein Beispiel für eine solche Messung wird in Abbildung 3.6 exemplarisch gezeigt. Wenn die PKC-Aktivität durch Staurosporin (Inkubation für 10 Minuten in 1 μ M) gehemmt war, konnte durch OAG und eine einmalige Gabe von NPPB ein Ionenstrom mit einer

geringeren Amplitude und einer anderen I-V als bei dem spontanen sehr großen Ionenstrom erzeugt werden (vgl. Abb. 3.6 B). In den weiteren Experimenten wurde 50 μM NPPB kontinuierlich in der Badlösung verwendet. Da die zuerst beobachteten sehr großen Ionenströme jedoch auch unter diesen Bedingungen immer wieder auftraten, wurde DIDS (engl. *4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic Acid*) in einer Konzentration von 50 μM als zweiter Cl^- -Kanal-Blocker hinzu genommen. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden unter einer dauerhaften Blockade der Chlorid-Kanäle mit NPPB und DIDS erhoben.

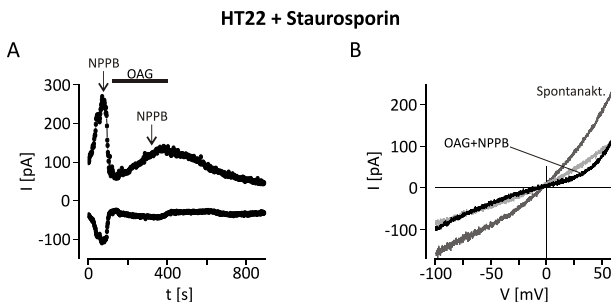


Abbildung 3.6 Exemplarische Ganzzellmessungen von HT22-Zellen

Darstellung einer einzelnen, exemplarischen Ganzzellmessung mit Einmalgaben von NPPB (50 μM). Aktivierung mittels OAG, Vorbehandlung mit Staurosporin zur PKC-Inhibition.

A Strom-Zeit-Verlauf des Ein- und Auswärtstroms bei Haltepotentialen von ± 60 mV; schwarzer Balken : Dauer des Applikation von OAG (100 μM) **B** repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen

3.3.2. Eigenschaften des Ionenstroms unter Chlorid-Kanal-Blockade

Der unter diesen Bedingungen beobachtete mutmaßliche Kationenstrom wies in den verschiedenen Versuchsanordnungen eine charakteristische Strom-Spannungsbeziehung auf (vgl. I-Vs in Abb. 3.7 - 3.12): der Ionenstrom war bei

negativen Spannungswerten größer und zeigte ab ca. -70 mV in den meisten Fällen ein geringes Rauschen. Das Umkehrpotential lag zwischen 0 und -5 mV. In allen Messungen kam es zu einem deutlichen Knick mit nachfolgendem flacheren Kurvenverlauf bei positiven Spannungswerten. Dieser Knick lag etwa zwischen 10-15 mV. Ionenströme mit dieser I-V konnten durch GTP γ S, DHPG (*engl. [RS]-3,5-Dihydroxyphenylglycin*) und OAG erzeugt werden (Abb. 3.7 und 3.9).

3.3.3. Einsatz von GTP γ S, OAG und DHPG in HT22-Zellen

GTP γ S ist ein direkter Aktivator von G-Proteinen und bekannt dafür, den TRPC5 zu aktivieren. DHPG wirkt als Agonist an metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR1 und 5), die zur Gruppe der G-Protein koppelnden Rezeptoren gehören, welche über eine Aktivierung der PLC ihr Signal weiterleiten (Aktories 2005), was ebenfalls zu einer Aktivierung des TRPC5 führen kann.

DHPG wurde bei HT22-Zellen eingesetzt, die mit verschiedenen siRNAs für 3 Tage transfiziert worden waren (vgl. Kapitel 3.4.). Außerdem waren diese Zellen direkt vor der Messung für 5 Minuten mit BIM-I (500 nM) zur Inhibition der PKC behandelt und i.d.R. zunächst mit OAG aktiviert worden. DHPG führte unter diesen Bedingungen, ebenso wie 500 μ M GTP γ S in nicht-transfizierten und anderweitig nicht aktivierten HT22-Zellen, zu einer signifikanten Aktivierung des oben beschriebenen Ionenstroms (vgl. Abb. 3.7 B+D).

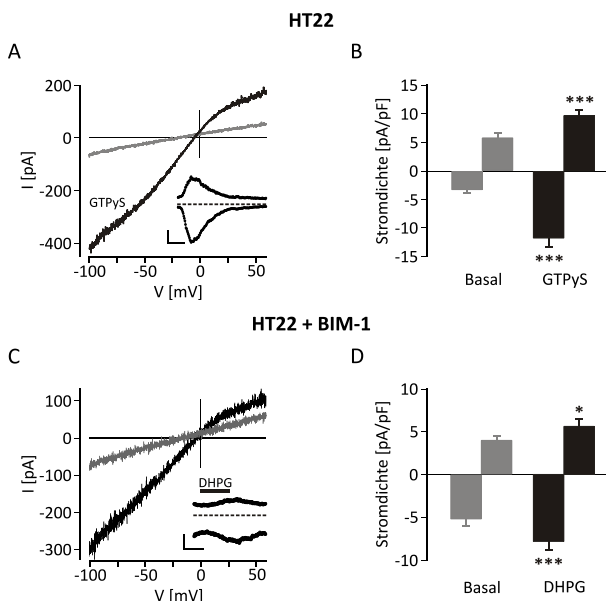


Abbildung 3.7 Einsatz von GTPyS und DHPG in HT22-Zellen

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA; C: der Balken steht für die Applikationsdauer von 100 μ M DHPG). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 14 Messungen an 3 (B) bzw. 7 Messungen an 5 unabhängigen Messtagen (D). Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

Als dritter Agonist wurde das DAG-Analogon OAG (100 μM) verwendet. Dieses war an 2 Messtagen in 4 Messungen (vgl. Abb. 3.8) nicht in der Lage, HT22-Zellen zu aktivieren, obwohl diese an den selben Tagen nach Behandlung mit den PKC-Inhibitoren Staurosporin oder BIM-I durch OAG aktivierbar waren. Die Aktivierung durch OAG nach einer PKC-Inhibition durch BIM-I konnte in insgesamt 45 Messungen an 13 verschiedenen Tagen in mit verschiedenen siRNAs transfizierten HT22-Zellen reproduziert werden (vgl. Kapitel 3.4. Abb. 3.10- 3.12)

An einem einzigen Messtag konnte OAG ohne vorherige Blockade der PKC einen Ionenstrom in den HT22-Zellen aktivieren (Abb. 3.9 C-D).

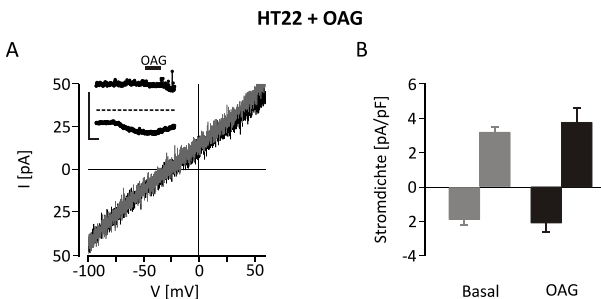


Abbildung 3.8 Einsatz von OAG in HT22-Zellen ohne PKC-Inhibition

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen von HT-22-Zellen. **A** zeigt repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit dem Strom-Zeit-Verlauf der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA; der Balken steht für die Applikationsdauer von 100 μM OAG). **B** Dazugehörige Stromdichte-Werten als Balkendiagramme aus 4 Messungen an zwei Messtagen.

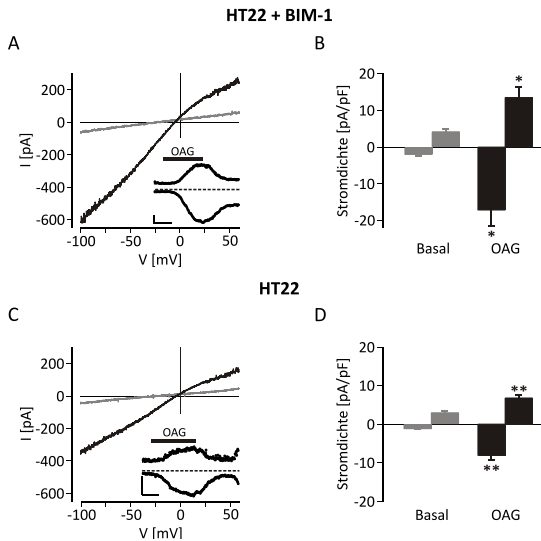


Abbildung 3.9 Einsatz von OAG in HT22-Zellen mit oder ohne PKC-Inhibition durch BIM-I

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen. A+B HT-22-Zellen wurden direkt vor der Messung für 5 Minuten mit 500 nM BIM-I vorbehandelt; C+D unbehandelte HT22-Zellen. Farbcode: grau - basal, schwarz - nach Aktivierung durch OAG. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA; der Balken steht für die Applikationsdauer von 500 μ M OAG). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus je 5 Messungen an einem Messtag. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

Die Stromdichten in den mit BIM-I vorbehandelten Zellen (mittlere Einwärtsstromdichte von -1,89 auf -17,17 pA; mittlere Auswärtsstromdichte von 4,03 auf 13,46 pA/pF) waren allgemein größer als in den nicht vorbehandelten Zellen (mittlere Einwärtsstromdichte von -1,06 auf -8,09 pA/pF; mittlere Auswärtsstromdichte von 2,81 auf 6,77 pA/pF). Der Unterschied war im unabhängigen t-Test nur knapp nicht signifikant (Einwärtsstrom p-Wert 0,077; Auswärtsstrom 0,054). Die Aktivierung durch OAG nach einer PKC-Inhibition durch BIM-I konnte in insgesamt 45 Messungen an 13 verschiedenen Tagen in mit verschiedenen siRNAs transfizierten HT22-Zellen reproduziert werden (vgl. Kapitel 3.4. Abb. 3.10 - 3.12)

3.4. Einsatz von siRNAs gegen TRPCs in HT22-Zellen

3.4.1. siRNAs gegen TRPC1, 3, 4, 6 und 7 in HT22-Zellen

Der im vorigen Abschnitt charakterisierte Ionenstrom, der in HT22-Zellen durch GTPyS, DHPG und OAG (konstant nur unter PKC-Inhibition) aktivierbar war, sollte auf eine Beteiligung von TRPC-Kanälen hin untersucht werden. Dazu wurden verschiedene siRNAs eingesetzt, die eine Translation der TRPC-mRNA in funktionstüchtige Proteine unterdrücken können. Ist der Ionenstrom nach dem Einsatz einer siRNA verringert oder aufgehoben, kann eine Beteiligung des jeweiligen Proteins an der Bildung des entsprechenden Ionenkanals angenommen werden (vgl. Kapitel 2.4.3.).

Die siRNAs gegen TRPC1, 3, 4, 6 und 7 wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Herrmann Kalwa zur Verfügung gestellt. Wie in Kapitel 2.4.4. erläutert, waren die siRNAs in die Vektoren pSuper bzw. pSuper.neo-GFP eingebaut, im Falle des TRPC6 hatte Herr Dr. Kalwa zudem die siRNA in dem Plasmid psPAX2 vorliegen und erstellte mit dessen Hilfe eine stabile Transfektion in den HT22-Zellen.

Die Aktivierung des Ionenstroms erfolgte mittels OAG, wobei die mit den siRNAs transfizierten HT22-Zellen kurz vor der Messung für 5 Minuten mit dem PKC-Inhibitor BIM-I behandelt worden waren. Keine siRNA konnte eine signifikante Aktivierung verhindern (Abb. 3.10-3.12).

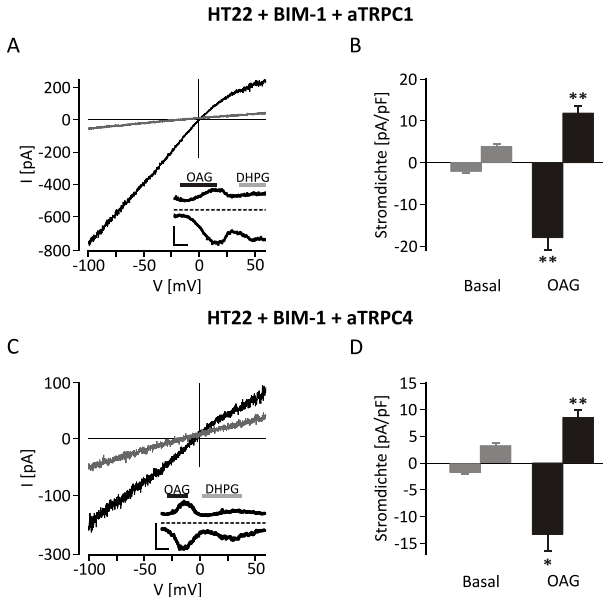


Abbildung 3.10 Testung der siRNAs aTRPC1 und aTRPC4 in HT22-Zellen

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen. A+B HT22-Zellen mit aTRPC1 C+D mit aTRPC4 transfiziert; kurz vor der Messung Behandlung der Zellen für 5 Minuten mit 500 nM BIM-I; Farbcode: grau - basal, schwarz - nach Aktivierung durch OAG. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA; schwarzer Balken - Applikationsdauer von OAG, grau - DHPG). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus je 6 Messungen von 2 (B) bzw. 3 (D) unabhängigen Transfektionen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

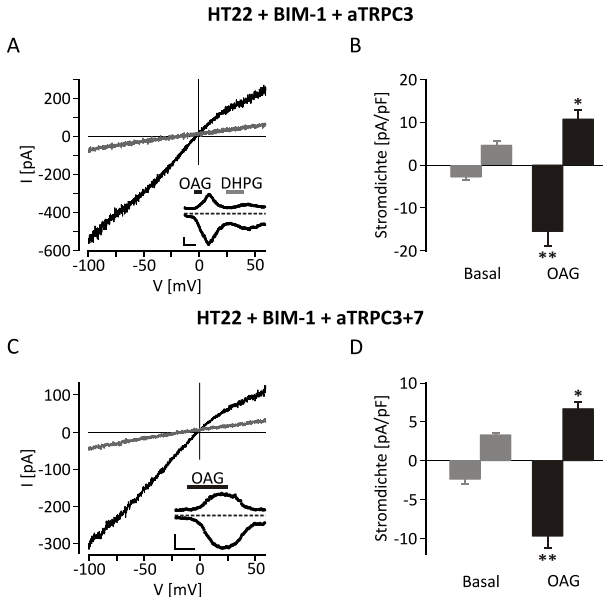


Abbildung 3.11 Testung der siRNAs aTRPC3 und aTRPC3+7 in HT22-Zellen

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen. A+B HT22-Zellen mit aTRPC3 C+D mit aTRPC3+7 transfiziert; kurz vor der Messung Behandlung der Zellen für 5 Minuten mit 500 nM BIM-1; Farbcode: grau - basal, schwarz - nach Aktivierung durch OAG. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA; schwarzer Balken - Applikationsdauer von OAG, grau - DHPG). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 6 (B) bzw. 7 (D) Messungen von je 2 unabhängigen Transfektionen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

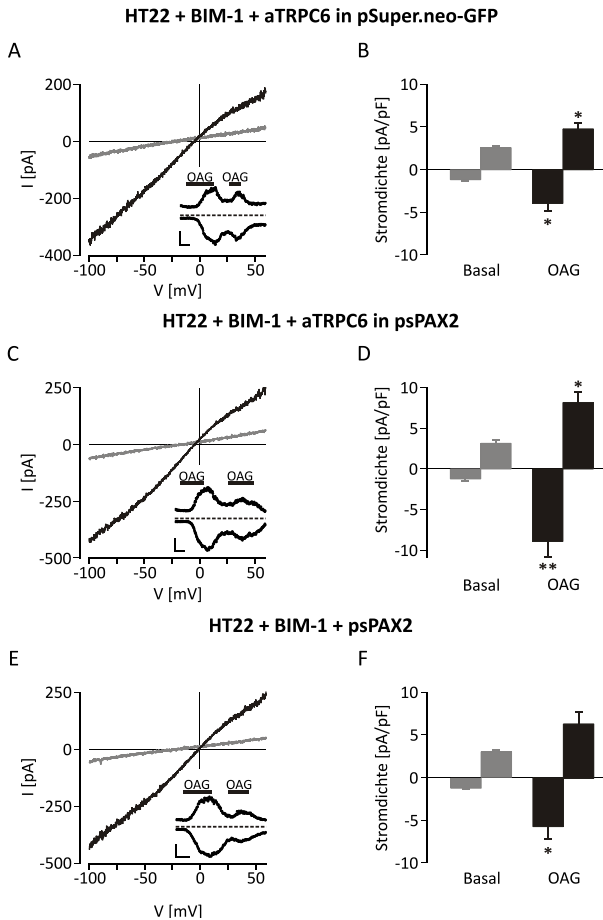


Abbildung 3.12 Testung der siRNA aTRPC6 in HT22-Zellen

Ganzzellmessungen in HT22-Zellen. A+B aTRPC6 in pSuper.neo-GFP C+D aTRPC6 stabile Transfektion in psPAX2 E+F Kontrolltransfektion des Vektors; vor der Messung Behandlung der Zellen für 5 Min. mit 500 nM BIM-I. **A, C und E** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA; schwarzer Balken - Applikationsdauer OAG). **B, D und F** Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 7 (B+D) bzw. 6 (F)

Messungen aus einer Transfektion (B) und einem (D) bzw. 2 (F) Messtagen. Signifikante Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

Um sicher zu gehen, dass die siRNAs keinerlei Effekt auf den in HT22-Zellen beobachteten Ionenstrom haben, wurde außerdem der Zugewinn an Stromdichte nach der Aktivierung durch OAG berechnet. Diese zusätzliche Stromdichte durch neu aktivierte Ionenkanäle erhält man, indem man von der mittleren Stromdichte nach Aktivierung die mittlere spontane Basalstromdichte abzieht. Sollte eine siRNA einen hemmenden Effekt auf die Bildung des Kanal-Proteins haben, sollten weniger Kanäle zur Aktivierung des Ionenstroms zur Verfügung stehen und somit auch die Zunahme der Stromdichte nach einer Aktivierung geringer ausfallen. Die Abbildung 3.13 zeigt die kumulative Stromdichtezunahme aller Messungen mit den genannten siRNAs im Vergleich zu den jeweiligen Effekten der einzelnen siRNAs. Wenn eine siRNA einen größeren Effekt auf den Ionenstrom haben sollte als die anderen siRNAs, sollte es in dieser Darstellung deutlich werden. Im Falle der siRNA gegen den TRPC6 zeigte sich ein kleiner Effekt (p-Wert <0,05) in der Einwärtsstromrichtung.

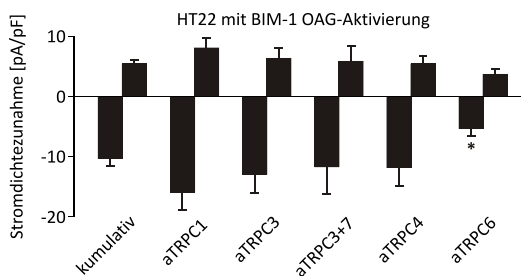


Abbildung 3.13 Vergleich der siRNA-Effekte auf TRPC1, 3, 4, 6 und 7 in HT22-Zellen

Ganzzellmessungen von HT22-Zellen, Transfektion von siRNAs gegen TRPCs. Unmittelbar vor der Messung 5 minütige Behandlung mit BIM-I (500 nM), Aktivierung durch OAG. In den Balkendiagrammen sind die basalen, zusammengefassten Stromdichten in Ein- und Auswärtsrichtung von denen nach Aktivierung abgezogen, sodass sich die Zunahme der Stromdichte durch die Aktivierung ergibt. Die Messungen mit den einzelnen siRNAs wurden mit allen zusammengefassten Messungen verglichen, um zu sehen, ob eine siRNA einen von den restlichen siRNAs abweichenden Effekt erzielt. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für unabhängige Stichproben.

Nachdem die Patch-Clamp-Messungen durchgeführt worden waren, wurde eine erneute Sequenzanalyse (vgl. Kapitel 2.4.5.) der siRNAs durchgeführt, da es unterschiedliche Angaben zur Spezifität der siRNAs gab. Dabei zeigte sich, dass die siRNAs gegen TRPC1, 3 und 4 spezifisch für die humane Sequenz des jeweiligen TRPCs waren, wobei die HT22-Zellen, wie oben bereits erläutert, aus dem Hippokampus der Maus stammen. Alle anderen eingesetzten siRNAs waren gegen die jeweilige TRPC-Sequenzen von Maus, Ratte und Mensch gerichtet.

3.5. Einsatz einer siRNA gegen TRPC5 in HEK-293- & HT22-Zellen

Nach dem Vorgehen, welches im Kapitel 2.4.4. und den darauf folgenden Abschnitten genauer erläutert wird, wurde eine siRNA gegen den TRPC5 (Bezeichnung: aTRPC5) neu erstellt, da unsere Arbeitsgruppe bisher keine siRNA gegen diesen Kanal besaß. Diese war nach der Berechnung sowohl gegen die Sequenz der Maus, als auch die des Menschen und der Ratte gerichtet.

3.5.1. Testung der siRNA gegen TRPC5 in HEK293-Zellen

Die neue für den TRPC5 spezifische siRNA wurde zunächst gegen den in HEK293-Zellen heterolog exprimierten murinen TRPC5 getestet. Dazu wurden HEK293-Zellen mit TRPC5, aTRPC5 und rM₅R transfiziert (Testzellen), wobei die siRNA für ein Fluoreszenzprotein kodierte. Eine zweite Gruppe wurde mit TRPC5 und rM₅R transfiziert (Kontrollzellen), wobei als Fluoreszenzmarker EGFP hinzu gegeben wurde. Da die siRNA im Idealfall den Einbau von TRPC5-Kanälen ganz verhindern kann, wurden für die Auswertung der folgenden Ergebnisse alle Messungen der Kontroll- und Testzellen berücksichtigt - unabhängig davon, ob es zu einer

Aktivierung und damit zur Darstellung der typischen I-V des TRPC5 kam oder nicht.

Sowohl die Kontrollzellen als auch die Testzellen zeigten eine hoch signifikante Aktivierung nach CCh-Stimulation. Vergleicht man jedoch die Mittelwerte der Stromdichten beider Gruppen, so zeigt sich, dass sowohl vor, als auch nach Stimulation die Stromdichte in den mit der siRNA transfizierten Zellen niedriger war, als in der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 3.14). Diese Unterschiede erreichten jedoch kein signifikantes Niveau (basale Einwärtsstromdichte -5,6 (Kontrollzellen) vs. -3,8 pA/pF (Testzellen), Einwärtsstromdichte nach Aktivierung -13,87 vs. -10,24 pA/pF, basale Auswärtsstromdichte 14,05 vs. 11,38 pA/pF, Auswärtsstromdichte nach Aktivierung 27,83 vs. 19,72 pA/pF).

Um sicherzustellen, dass diese Beobachtungen für die siRNA nicht auf einer Blockade der Kanal-Aktivierung über den Rezeptor beruhen und um deren möglichen Effekt auf andere TRPC-Kanäle zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment auch mit murinen TRPC3 und 6 durchgeführt und nach dem gleichen Schema ausgewertet. In beiden Fällen kam es sowohl in den mit aTRPC5 transfizierten Testzellen, als auch in den Kontrollzellen zu hoch signifikanten Aktivierungen (vgl. Abb. 3.15 und 3.16). Die Strom-Spannungsbeziehung waren in beiden Fällen in den Test- und Kontrollzellen identisch und zeigten die für den jeweiligen TRPC typischen Charakteristika. Generell war die Basalstromdichte und die Stromdichten nach Aktivierung für beide TRPCs höher als im Fall des TRPC5. Der TRPC3 zeigte die größte basale Aktivität und es kam bei 4 Messungen der Test- und bei 5 Messungen der Kontrollzellen zu einer spontanen Aktivierung des Kanals. Die CCh-haltige Badlösung wurde dennoch in allen Fällen appliziert.

Im Fall des TRPC3 waren die Mittelwerte der Stromdichten beider Gruppen vor und nach Stimulation nahezu identisch. Die Testung des TRPC6 in Kotransfektion

mit aTRPC5 zeigte eine leicht geringere mittlere Stromdichte vor und nach Aktivierung als in der Kontrollgruppe, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren. Der prozentuale Unterschied in der Test- und Kontrollgruppe fiel wesentlich geringer als es für TRPC5 der Fall gewesen war (basale Einwärtsstromdichte -12,36 (Kontroll-) vs. -5,13 pA/pF (Testzellen), Einwärtsstromdichte nach Aktivierung -107,35 vs. -103,99 pA/pF, basale Auswärtsstromdichte 23,25 vs. 11,33 pA/pF, Auswärtsstromdichte nach Aktivierung: 202,6 vs. 182,2 pA/pF).

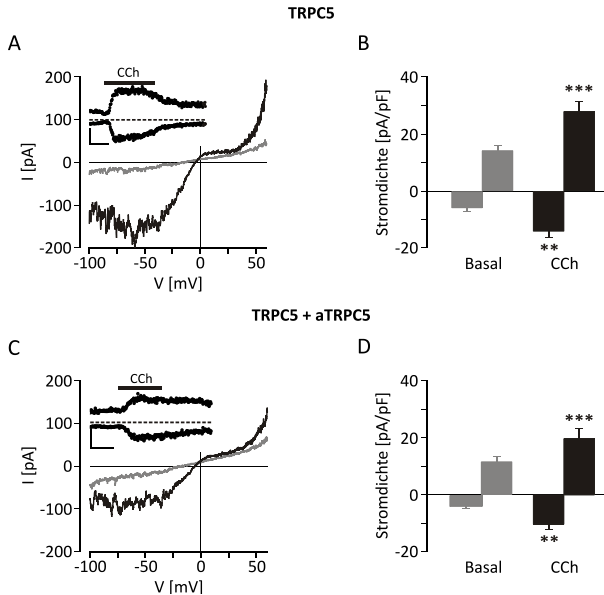


Abbildung 3.14 Testung von aTRPC5 gegen TRPC5: Aktivierung der Test- und Kontrollzellen mit CCh

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen: A+B - Kontrollzellen, C+D - Testzellen; Transfektionen siehe Text. Farbkodierung: schwarz - CCh (100 μ M), grau - Basalstrom. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; die Balken stehen für die Applikationsdauer von CCh; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 18 (B) bzw. 19 (D) Messungen und je 3 unabhängigen Transfektionen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

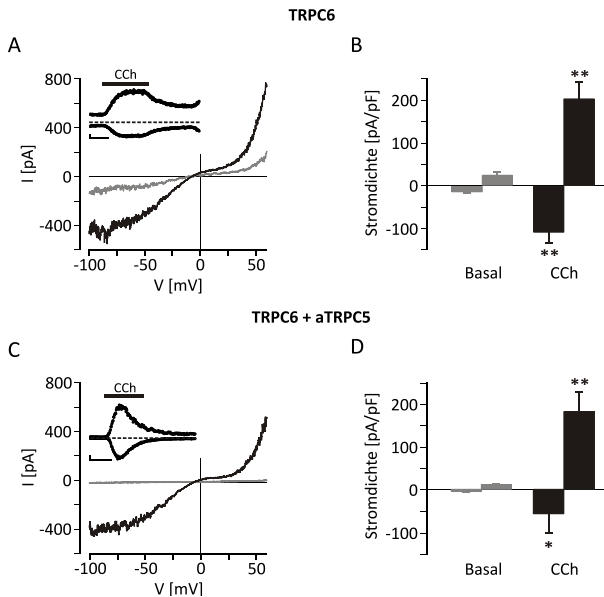


Abbildung 3.15 Testung von aTRPC5 gegen TRPC3: Aktivierung der Test- und Kontrollzellen mit CCh

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen: A+B - Kontrollzellen (Transfektion: TRPC3+ rM₅R +EGFP), C+D - Testzellen (Transfektion: TRPC3 + aTRPC5 + rM₅R); Farbkodierung: schwarz - CCh (100 μ M), grau - Basalstrom. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; die Balken stehen für die Applikationsdauer von CCh; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 12 (B) bzw. 20 Messungen (D) und je 3 unabhängigen Transfektionen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

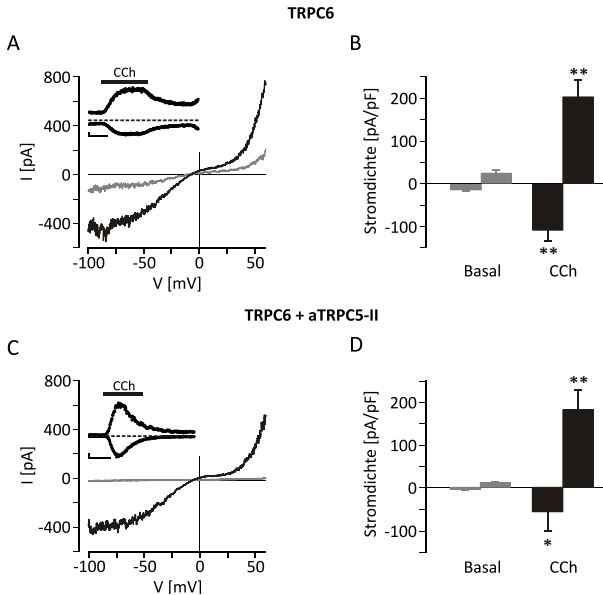


Abbildung 3.16 Testung von aTRPC5 gegen TRPC6: Aktivierung der Test- und Kontrollzellen mit CCh

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen: A+B - Kontrollzellen (Transfektion: TRPC6+ rM₅R +EGFP), C+D - Testzellen (Transfektion: TRPC6 + aTRPC5 + rM₅R); Farbkodierung: schwarz - CCh (100 µM), grau - Basalstrom. **A und C** zeigen repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit den jeweiligen Strom-Zeit-Verläufen der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ±60 mV (kleiner Graph; die Balken stehen für die Applikationsdauer von CCh; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA). **B und D** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 9 (B) bzw. 12 Messungen (D) und je 2 unabhängigen Transfektionen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

Da die siRNA eine signifikante Aktivierung nicht verhindern konnte, ist davon auszugehen, dass sie in dem Überexpressionsmodell die Translation der mRNA der TRPCs nicht vollständig unterdrücken konnte. Es sollte nun berechnet werden, ob sie möglicherweise die Anzahl der Ionenkanäle verringern konnte, was sich in Verringerung des Stromzuwachs nach der Kanalaktivierung in den Testzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen widerspiegeln sollte.

Die Differenz der mittleren Stromdichte nach Aktivierung und der mittleren Basalstromdichte war in Kontroll- und Testzellen im Falle des TRPC5 nicht signifikant unterschiedlich. Aber auch hier lagen die Werte der Testzellen unter denen der Kontrollzellen: Die Zunahme der mittleren Stromdichte in Auswärtsrichtung war bei den Testzellen 40% geringer als bei den Kontrollzellen (Differenz Einwärtsstromdichte: -8,27 (Kontroll-) vs. -6,44 pA/pF (Testzellen), Differenz Auswärtsstromdichte: 13,78 vs. 8,35 pA/pF; vgl. Abb. 3.17).

Im Fall des TRPC3 zeigten sich für Test- und Kontrollzellen keine Unterschiede, wobei die Einwärtsströme in den Testzellen sogar größer waren. Das gleiche Bild bot sich bei der Auswertung für den TRPC6.

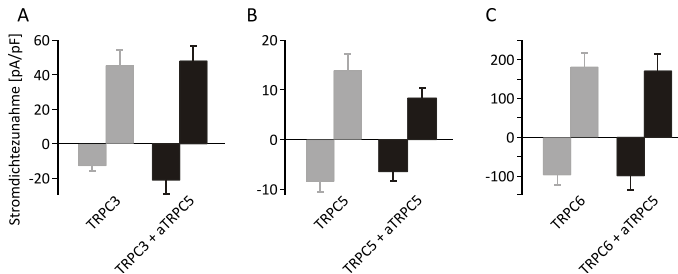


Abbildung 3.17 Vergleich der Stromdichtezunahme von TRPC3, 5 und 6 mit und ohne aTRPC5

In den Balkendiagrammen ist die Stromzunahme in Ein- und Auswärtsrichtung nach Aktivierung durch 100 μ M Carbachol dargestellt: Dazu wurden die basalen, zusammengefassten Stromdichten von denen nach Aktivierung abgezogen. In alle HEK293-Zellen war der Rezeptor rM₅R transfiziert. In Grau sind die Messungen der Kontrollzellen, welche den entsprechenden Kanal (A - TRPC3, B - TRPC5, C - TRPC6) und EGFP enthielten, dargestellt. Die Testzellen der in schwarz dargestellten Messungen enthielten zusätzlich zum jeweiligen Kanal die siRNA aTRPC5, welche selbst für ein Fluoreszenzprotein kodierte.

3.5.2. Einsatz der siRNA gegen TRPC5 in HT22-Zellen

Die siRNA aTRPC5 wurde ebenfalls in den HT22-Zellen eingesetzt, um zu überprüfen, ob sie den Ionenstrom unterbinden kann. Die Aktivierung der Zellen erfolgte in diesem Fall mit GTP γ S, da zu diesem Zeitpunkt eine regelmäßige Aktivierung der HT22-Zellen durch OAG nach vorheriger PKC-Inhibition nicht möglich war.

Es zeigte sich, dass aTRPC5 den Ionenstrom nahezu komplett unterdrücken konnte (Abb. 3.18), während in den nicht-transfizierten Kontrollzellen eine Aktivierung mittels GTP γ S problemlos möglich war (Abb. 3.7 A+B).

Auch für diese Messungen wurde die Stromdichtezunahme durch die Aktivierung mittels GTP γ S errechnet. Als Vergleich wurde die Stromdichtezunahme nach

Aktivierung in den nativen, untransfizierten Kontrollzellen hinzugezogen. Dabei zeigte sich ein hochsignifikanter Effekt für aTRPC5 (Abb. 3.19) Die Differenz der Stromdichte ging durch den Einsatz der siRNA im Vergleich zum am selben Tag gemessenen, nativen HT22-Zellen von -8,47 auf -1,69 pA/pF in Einwärtsstromrichtung und von 4 pA/pF auf 0,72 pA/pF in Auswärtsstromrichtung herunter.

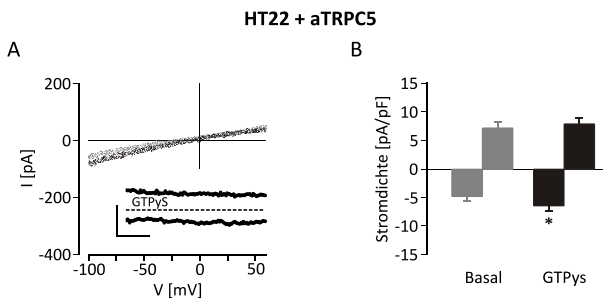


Abbildung 3.18 Testung der siRNAs aTRPC5 in HT22-Zellen

Darstellung exemplarischer Ganzzellmessungen. A+B HT22-Zellen transfiziert mit der siRNA aTRPC5; Aktivierung mit 500 μ M GTP γ S in der Pipettenlösung; Farbcode: grau - basal, schwarz - nach Aktivierung.

A zeigt eine repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen (großer Graph) mit dem Strom-Zeit-Verlauf der Ein- und Auswärtsströme bei Haltepotentialen von ± 60 mV (kleiner Graph; gestrichelte Linie - Nullstromniveau; Skalierung: 50s und 100 pA). **B** Dazugehörige Stromdichte-Werte als Balkendiagramme aus 17 Messungen an drei unabhängigen Messtagen. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für paarweise Stichproben.

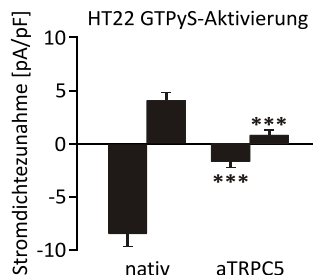


Abbildung 3.19 Vergleich der siRNA-Effekte gegen TRPC5 in HT22-Zellen

Ganzzellmessungen von HT22-Zellen, Transfektion mit siRNA gegen TRPC5. Aktivierung durch GTPyS. In den Balkendiagrammen sind die basalen, zusammengefassten Stromdichten in Ein- und Auswärtsrichtung von denen nach Aktivierung abgezogen, sodass sich die Zunahme der Stromdichte durch die Aktivierung ergibt. Die Messungen wurden an den gleichen Versuchstagen als nicht transfizierten Kontroll- (nativ) und Testmessungen (aTRPC5) durchgeführt. Angabe der signifikanten Unterschiede entsprechend der t-Tests für unabhängige Stichproben.

4. DISKUSSION

4.1. DAG/OAG-Sensitivität des TRPC5

4.1.1. OAG-Sensitivität der Mutanten TRPC5-T972A, -T752A & -S666A

Für die vorliegende Arbeit wurden 3 Mutanten des TRPC5-Kanals erstellt. Dabei war jeweils eine mögliche Phosphorylierungsstelle so mutiert, dass keine Phosphat-Gruppe mehr an die betreffende Aminosäure angehängt werden konnte. Diese Mutanten wurden in Whole-Cell Patch-Clamp-Messungen in HEK293-Zellen auf ihre Aktivierbarkeit durch das DAG-Analogon OAG hin untersucht. Die Mutante TRPC5-T972A war sowohl durch OAG, als auch CCh aktivierbar, wobei kein G_q - oder G_i -koppelnder Rezeptor koexprimiert oder PKC-Inhibitor appliziert war. Dabei zeigte sich die typische Strom-Spannungsbeziehung des TRPC5. Die Mutante TRPC5-T752A war bei alleiniger Expression weder durch OAG, noch durch CCh aktivierbar. Unter einer Rezeptor-Koexpression (rM₅R) konnte mittels CCh und GTPγS ein TRPC5-typischer Ionenstrom erzeugt werden, nicht jedoch mittels OAG. Die dritte Mutante TRPC5-S666A konnte weder bei alleiniger, noch bei einer Rezeptor-Koexpression, mit OAG, CCh oder GTPγS aktiviert werden.

Um weiter abzuklären, ob die Koexpression von G_q - oder G_i -koppelnden Rezeptoren mit dem TRPC5 einen Effekt auf die Aktivität der Proteinkinase C hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit der PepTag[®] Assay der Firma Promega zur Bestimmung der PKC-Aktivität etabliert werden. Die Etablierung gelang jedoch auch in zahlreichen Variationen nicht (siehe dazu im Anhang Kapitel 5.4.). Unsere Arbeitsgruppe konnte mittlerweile ein Western-Blot-Verfahren etablieren, dass

die Aktivität der PKC bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die PKC-Aktivität in HEK293-Zellen, die nur mit TRPC5 transfiziert waren, nicht von der unterschied, die zusätzlich den Rezeptor rM_5R enthielten (Storch et al. 2015, Zur Veröffentlichung eingereicht).

4.1.2. DAG/OAG-Sensitivität des TRPC5 in Abhängigkeit von der PKC

Wie in Kapitel 1.5. ausführlich dargestellt gelten TRPC2, 3, 6 und 7 als aktivierbar durch DAG und sein Analogon OAG. TRPC4 und 5 gelten ebenso als rezeptorgesteuert und PLC-abhängig aktivierbar, konnten bisher jedoch nicht durch DAG oder OAG aktiviert werden (Zholos 2014).

Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass TRPC4 und 5 in HEK293-Zellen durch DAG/OAG aktivierbar werden, wenn entweder die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) mittels Staurosporin oder BIM-I gehemmt wurde, oder die Kanäle mit G_q - oder G_i -koppelnden Rezeptoren für 3 Tage koexprimiert waren (vgl. Abb. 3.1 und Ren, 2007).

Die hier vorgestellten Ergebnisse können diese Beobachtungen zum Teil unterstützen. Das Threonin an Position 972 des TRPC5 stellt eine mögliche Phosphorylierungsstelle durch die PKC dar (Zhu et al. 2005). Eine Mutation des Threonins zu Alanin, dem keine Phosphatgruppe angehängt werden kann, führt zu einer OAG-Aktivierbarkeit des TRPC5. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine Phosphorylierung durch die PKC an dieser Stelle den Kanal für DAG/OAG unempfindlich macht.

Die Ergebnisse werfen jedoch auch neue Fragen auf. Die Mutante TRPC5-S752A war bei alleiniger Überexpression in HEK293-Zellen weder durch OAG, noch über die endogenen Rezeptoren mittels CCh aktivierbar. Damit stellt das Serin entweder keine Phosphorylierungsstelle für die PKC dar, oder eine

Phosphorylierung spielt keine Rolle im Zusammenhang mit der DAG/OAG-Sensitivität. Bei einer Koexpression der Mutante mit dem Rezeptor rM₅R gelang die Aktivierung mittels CCh und GTPγS, jedoch weiterhin nicht durch OAG. Der native TRPC5 wurde jedoch, wie oben beschrieben, in den vorangegangenen Experimenten durch eine Koexpression mit diesem Rezeptor für OAG sensitiv, sodass eine Phosphorylierung an dieser Stelle anscheinend auf einem anderen Weg auf die OAG-Sensitivität des TRPC5 einen möglicherweise hemmenden Einfluss nimmt.

Die Mutante TRPC5-S666A war weder bei alleiniger, noch bei einer Koexpression mit dem Rezeptor rM₅R, durch CCh, GTPγS oder OAG aktivierbar und ist anscheinend kein funktionstüchtiger Kanal. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Zhu et al. (Zhu et al. 2005), welche die Mutante bei einer Koexpression mit einem Rezeptor durch CCh aktivieren konnten.

4.1.3. Einfluss der Proteinkinase C auf TRPC-Kanäle

Der Einfluss der PKC auf den TRPC5 wurde bereits durch Zhu (2005) und seine Kollegen untersucht. Sie konnten durch eine Inhibition der PKC die Dauer der Aktivierung des TRPC5 durch CCh verlängern. In der gleichen Arbeit führte eine Aktivierung der Mutante TRPC5-T972A mit CCh zu einer wesentlich längeren Stromantwort, als es für den Wildtyp der Fall war. Durch eine Steigerung der Aktivität der PKC wurde der TRPC5 für GTPγS unsensitiv. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen, dass eine Phosphorylierung des TRPC5 durch die PKC am Threonin in Position 972 zu einer Inaktivierung des Kanals führt (vgl. Kapitel 1.6.).

Die Beobachtung, dass die Mutation T972A zu einer verlangsamten Inaktivierung des TRPC5 nach CCh-Stimulation führt, bestätigte sich in dieser Arbeit. Dies kann man in dem exemplarischen Strom-Zeit-Verlauf in der Abbildung 3.2 auf Seite 56 gut erkennen. Die Aktivierungsdauer konnte jedoch nicht genau quantifiziert werden, da es keine einheitlichen Applikationsschemata gab und sich dadurch die Endpunkte der Aktivierung nicht genau bestimmen lassen. Interessanterweise führte jedoch die Aktivierung durch OAG nur zu einer kurz anhaltenden Aktivierung der Mutante - selbst wenn der Agonist weiterhin appliziert wurde.

Die Beobachtung von Zhu und Kollegen (2005) werden auch durch andere Arbeiten unterstützt. Für TRPC3, 4, 5 und 6 konnte auf verschiedenen Wegen eine Phosphorylierung und damit einhergehende Inhibition durch die PKC nachgewiesen werden (Venkatachalam, Zheng, and Gill 2003, Trebak et al. 2005, Bousquet, Monet, and Boulay 2010, Kim and Saffen 2005). Diese Arbeiten werden in der Einleitung im Kapitel 1.6. ausführlich vorgestellt.

Die aufgezählten Veröffentlichungen konzentrieren sich alle auf die Inaktivierung der TRPC-Kanäle. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Aktivierung mittels CCh oder GTPγS aufgrund einer Phosphorylierung durch die PKC beendet oder bei gesteigerter Aktivität der PKC von vorneherein verhindert werden konnte. Dies legt die Annahme nahe, dass die Phosphorylierung wie ein Ausschalter auf die untersuchten Kanäle wirkt. Die Beobachtungen führten zu der Vorstellung, dass eine physiologische Aktivierung der TRPCs durch eine Rezeptorstimulation auf einem schnellen Weg stattfindet und die Inaktivierung über die PKC auf einem langsameren Weg nachfolgt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte mit den vorhergehenden Versuchen und den in dieser Arbeit vorgelegten Daten hingegen zeigen, dass eine Verhinderung der Phosphorylierung im Falle des TRPC5 zu einer neuen Aktivierungsmöglichkeit

durch DAG/OAG führt, die bei einer normalen oder gesteigerten Aktivität der PKC nicht beobachtet wird.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, ist sowohl die rezeptorabhängige, als auch die direkte Aktivierung des TRPC5 durch DAG/OAG auf unphosphorylierte Ionenkanäle angewiesen. Im Falle der Rezeptorstimulation kann eine Aktivierung des TRPC5 auch bei einer normalen PKC-Aktivität erfolgen. Die Beendigung des Ionenstroms erfolgt erst auf die ebenfalls durch die Rezeptorstimulation gesteigerte PKC-Aktivität hin. Im Falle der direkten Aktivierung des TRPC5 durch DAG/OAG muss die Aktivität der PKC erniedrigt sein - entweder damit noch mehr Ionenkanäle in einem unphosphorylierten Zustand vorliegen, oder weil nicht nur die Phosphorylierung des Kanals an sich für die DAG/OAG-Sensitivität entscheidend ist, sondern noch weitere Mechanismen wie z.B. Interaktionen mit anderen Proteinen eine Rolle spielen. Einige der am Rande gemachten Beobachtungen sprechen dafür, dass Letzteres wahrscheinlicher ist. Zum einen stellt sich weiterhin die Frage, wie die Koexpression von G_q - und G_i -koppelnden Rezeptoren unabhängig von der PKC zu einer DAG/OAG-Sensitivität des TRPC5 führen und auf welchem Weg die Mutation T752A dies wieder rückgängig machen kann. Zum anderen ist die Inaktivierungskinetik der Mutante TRPC5-T972A für CCh wesentlich langsamer als für OAG. Beide Beobachtungen lassen sich mit einer alleinigen Abhängigkeit von der PKC-Aktivität nicht erklären.

4.1.4. Resultierende Experimente aus diesen Ergebnissen

Unsere Arbeitsgruppe stand an diesem Punkt vor zwei Fragen. Erstens: Auf welchem Weg führt die Rezeptorkoexpression unabhängig von der PKC zur DAG/OAG-Sensitivität von TRPC4 und 5? Zweitens: Welche Änderung tritt durch

die Phosphorylierung des Threonins an Position 972 durch die PKC ein, sodass TRPC5 dann nicht mehr DAG/OAG-sensitiv ist?

Die Ergebnisse, die diese Fragen beantworten und zusammen mit den hier schon dargestellten Beobachtungen 2015 (Storch et al.) für eine Veröffentlichung eingereicht wurden, sollen an dieser Stelle kurz zusammengefasst werden.

Wie in Abbildung 1.1 auf Seite 13 dargestellt, fällt die Phosphorylierungsstelle T972A des TRPC5 in die Region, die das Motiv VTTLR aufweist (durch die Mutation entstand das Motiv: VATLR). An dieser Stelle können Bindungsproteine wie NHERF (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*) an den Kanal binden und eine Brücke zum Zytoskelett und wichtigen anderen Proteinen, wie in diesem Fall z.B. die Phospholipase C, bilden (Tang et al. 2000, Lee-Kwon et al. 2005). Diese Bindungsstelle kommt in der TRPC-Familie nur in TRPC4 und 5 vor. Sie spielt beim TRPC4 u.a. eine Rolle beim Einbau und der Verteilung des Kanalproteins in der Zellmembran (Mery et al. 2002) und bei der Interaktion mit dem auf ihn inhibitorisch wirkenden PIP₂ (Otsuguro et al. 2008). Eine Überexpression von NHERF verzögerte den Beginn eines Ionenstroms nach Rezeptorstimulation deutlich, wobei dies ebenso wie eine Deletion des VTTRL-Motivs keine Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften des TRPC5 zur Folge hatte (Obukhov and Nowycky 2004).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe von TRPC5-transfizierten CHO-K1-Zellen mittels Immunoprecipitation konnten bestätigen, dass TRPC5 mit NHERF interagiert. Erfolgte eine Co-Expression von TRPC5 mit rM₅R konnte die Interaktion nicht mehr nachgewiesen werden. Die Kotransfektion des TRPC5 mit einer siRNA gegen NHERF oder einer NHERF-Mutante, die nicht an den Kanal binden kann, machte in HEK293-Zellen den Kanal für OAG sensitiv. Der endogene TRPC4 in HKC8-Zellen konnte zudem bei einer PKC-Inhibition oder einer

Transfektion mit der NHERF-Mutante ebenfalls mittels OAG aktiviert werden. Otsuguro et al. (2008) hatten postuliert, dass NHERF eine Konformation des TRPC4 stabilisiert, die auch PIP_2 bindet, welches den Kanal inhibiert. Dieser bekannte inhibitorische Effekt des PIP_2 (Trebak et al. 2009) konnte bestätigt werden, wobei ein Abbau des PIP_2 z.B. mittels Wortmannin zu einer OAG-Sensitivität des TRPC5 führte. In speziellen Patch-Clamp-Messungen, die als "perforated-patch" durchgeführt wurden und sich dadurch auszeichnen, dass sie den Intrazellularraum kaum verändern, wurde über den endogenen M_3 -Rezeptor ein TRPC5-Strom in HEK-293-Zellen ausgelöst, der durch die Applikation von OAG signifikant verstärkt werden konnte. Diese Beobachtung legt nahe, dass auch bei einer herkömmlichen Rezeptoraktivierung der Kanal für DAG/OAG sensibel wird. Zuletzt wurde der Zusammenhang zwischen PIP_2 und NHERF untersucht. In FRET-Analysen zeigte sich, dass ein PIP_2 -Abbau mittels Wortmannin ebenso zu einer Trennung von NHERF und TRPC5 führt, wie eine Rezeptoraktivierung mittels CCh. Die Mutante TRPC5-T972A zeigte keine Bindung zu NHERF.

4.1.5. *Schlussfolgerungen mit Blick auf vorangegangene Erkenntnisse*

Die in dieser Arbeit vorgestellte Beobachtung zur OAG-Sensitivität von TRPC4 und 5 ist ein entscheidendes Puzzleteil im Verständnis des Rezeptor-abhängigen Aktivierungswegs dieser Kanäle. Zusammen mit den bekannten Interaktionen mit NHERF und dem inhibitorischen PIP_2 , deren Funktionen bisher nicht vollständig verstanden war (Trebak et al. 2009, Otsuguro et al. 2008), ergibt sich folgender möglicher Aktivierungsmechanismus:

In Ruhe stabilisiert NHERF über seine Bindung an das C-terminale Ende des TRPC4 und 5 eine OAG-unempfindliche Konfiguration des Kanals. Dabei scheint für die Bindung eine Phosphorylierung an der Stelle T972 von Bedeutung zu sein. PIP_2

wird im Falle des TRPC4 vermutlich ebenfalls über das C-terminale Ende an diesen Komplex gebunden (Otsuguro et al. 2008). Für TRPC5 ist noch nicht geklärt, wie er mit PIP_2 interagiert. Ebenfalls über die Bindung an das Zytoskelett werden vermutlich die Phospholipase C (Tang et al. 2000) und ein Rezeptor (Weinman et al. 2006) in der Nähe des Kanals in der Zellemembran fixiert (vgl. Abbildung 4.1). Durch eine Rezeptoraktivierung kommt es zu einem Abbau des PIP_2 durch die PLC, was auf einem noch unbekannten Weg die Trennung zwischen NHERF und TRPC4 und 5 zur Folge hat. Dadurch werden die Ionenkanäle für das PIP_2 -Abbauprodukt DAG sensibel und es kommt zu einem Kationeneinstrom. DAG aktiviert die PKC, die wiederum den TRPC5 an Position 972 phosphoryliert und dadurch die Kanalaktivierung beendet (Zhu et al. 2005). Die Phosphorylierung würde im hier vorgestellten Modell zu einer erneuten Bindung des Kanals an NHERF führen und somit wieder die DAG-insensitive Konformation erzeugen.

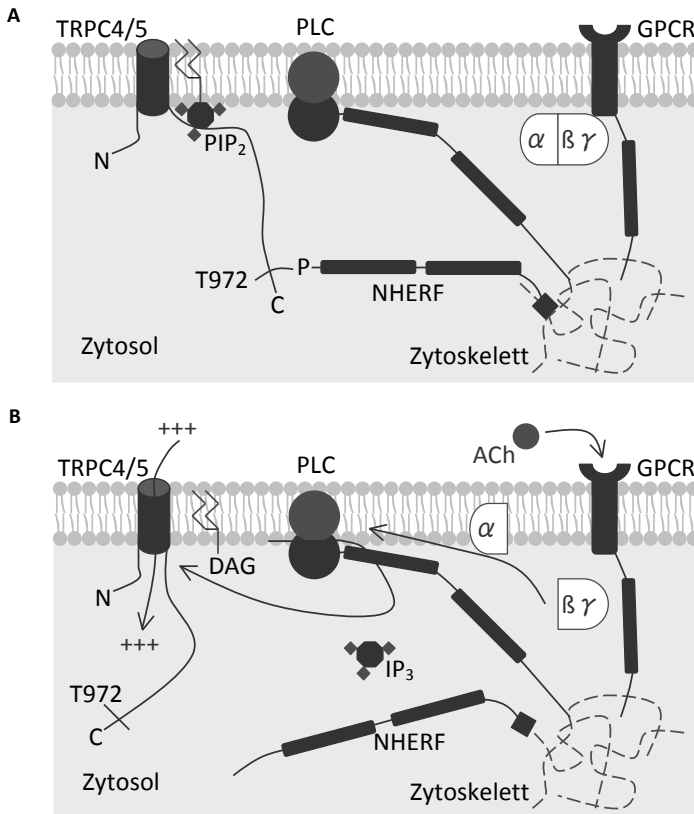


Abbildung 4.1 Rezeptoraktivierung von TRPC4 und 5

A In Ruhe binden TRPC4/5 über ihre Region mit der Sequenz VTTLR am C-terminalen Ende an das Bindungsprotein NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor). Im Falle des TRPC5 ist darin die Phosphorylierungsstelle Threonin 972 enthalten. Zusammen mit PIP₂, welches ebenfalls über das C-terminale Ende an die Kanäle bindet, stabilisiert NHERF einen DAG-insensitiven Zustand der Kanäle und bindet sie an das Zytoskelett. Die Phospholipase C (PLC) und der G_q-koppelnde Rezeptor (GPCR) werden ebenfalls über NHERF-Proteine am Zytoskelett fixiert.

B Die Bindung eines Agonisten (hier: ACh - Acetylcholin) führt zu einer Aufspaltung des G-Proteins und in diesem Fall aktiviert die G_q-Untereinheit die PLC, welche PIP₂ in DAG und IP₃ spaltet. Durch die Spaltung von PIP₂ kommt es zu einer Auflösung der Bindung zwischen Kanal und NHERF, wodurch TRPC4/5 für DAG sensibel und somit durch das in der Spaltung anfallende DAG aktiviert werden.

Dieser Rezeptoraktivierungsweg scheint jedoch parallel zu einem zweiten Aktivierungsmechanismus zu existieren. Gross und seine Kollegen (2009) konnten parallel zur Arbeitsgruppe um Blair (2009) zeigen, dass eine Aktivierung des TRPC5 mit CCh (via G_q -koppelnden Rezeptor) oder EGF (via Rezeptortyrosinkinase) in Abwesenheit von intrazellulären Ca^{2+} nicht möglich ist. Eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) konnte jedoch die Rezeptor-Aktivierung verstärken, sodass ein modulierender Effekt für intrazelluläres Ca^{2+} angenommen werden muss. Zudem konnten künstliche Steigerungen der $[Ca^{2+}]_i$ ohne ein anderes Signal einen TRPC5-Strom erzeugen. Die Aktivierung gelang auch durch einen Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, sodass wahrscheinlich auch unter physiologischen Bedingungen ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ allein als Signal für eine Aktivierung des TRPC5 ausreicht. Dies kann auch die früheren Beobachtung, wonach TRPC5 am "store-operated Calcium-entry" beteiligt sei, erklären. Zudem konnten die Kollegen zeigen, dass PIP_2 diesen Aktivierungsweg nicht inhibiert.

Aufgrund der guten und breiten Datenlage für beide Aktivierungswege muss man sich sicherlich dem Fazit der Kollegen um Gross anschließen und festhalten, dass die Rezeptor-gesteuerte Aktivierung neben der Aktivierung durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration existiert und sich beide Wege gegenseitig beeinflussen.

Eine zweite Beobachtung, die in dem hier dargestellten Mechanismus nicht berücksichtigt wird, ist die Inaktivierung durch die Proteinkinase A nach vorherigem Signal über einen G_s -koppelnden Rezeptor und cAMP als second messenger. Eine Aktivierung des TRPC5 durch GTPyS konnte mittels cAMP-Analoga und einer dauerhaft aktiven Variante des G_s -Proteins beendet bzw. unterbunden werden (Sung et al. 2011). Die Arbeitsgruppe konnte auch zwei

verantwortliche PKA-Phosphorylierungsstellen (Serin 794 und 796) identifizieren. Eine Inhibition der PKA führte in unseren Untersuchungen zu keiner OAG-Sensitivität des TRPC5 und hat womöglich einen von NHERF/PIP₂/DAG völlig unabhängigen Effekt auf den TRPC5.

Diese Zusammenfassung zeigt einmal mehr, dass die TRPC-Kanäle ein Ziel von verschiedenen Signalkaskaden sind und damit ihre Aktivierung als Integration dieser Signale verstanden werden kann. Auch kann dadurch ihre Funktion je nach Gewebe oder aktueller Situation der Zelle sehr unterschiedlich sein.

4.1.6. Ausblick

Einige Fragen bleiben zu diesem Zeitpunkt unbeantwortet. So ist unklar, wie eine PIP₂-Spaltung und die Dissoziation von NHERF und Kanal zusammenhängen. Spielt dabei eine Dephosphorylierung an der Stelle T972 des TRPC5 eine Rolle? Die Dephosphorylierung scheint nötig, denn nur dann kann die erneute Phosphorylierung mittels der PKC den Kanal wieder inaktivieren (Zhu et al. 2005). Warum ist bei der Mutante TRPC5-T972A der durch OAG aktivierte Ionenstrom nur kurz und der nach einer CCh-Rezeptor-Aktivierung lang anhaltend? Der Unterschied liegt anscheinend darin, dass OAG die Mutante zwar alleine aktivieren kann, bei einer wirklichen Rezeptoraktivierung viel mehr Einflüsse auf die Kanalaktivierung eine Rolle spielen, wie z.B. die Ca²⁺-Konzentration, die An- bzw. Abwesenheit von PIP₂ oder die Aktivität der PKA.

Auch ist unklar, warum die TRPC5-Mutante S752A bei einer Rezeptor-Koexpression nicht sensibel für OAG wurde. Serin an Position 752 liegt in einem Bereich, der für den TRPC4 für die Bindung von Spektrin entscheidend ist (Odell, Van Helden, and Scott 2008). Diese Region ist wiederum in der TRPC-Familie nur in TRPC4 und 5 enthalten. Zudem enthält β -Spektrin zwei Bindungsstellen für PIP₂

(Boguslawska et al. 2014). Möglicherweise bildet das Spektrin die fehlende Brücke zwischen TRPC5 und PIP₂, zwischen denen eine direkte Bindung nicht nachgewiesen werden konnte. Durch die genauere Untersuchung dieser Region kann zunächst eruiert werden, wie die Interaktion zwischen TRPC5 und PIP₂ erfolgt. Dabei ergeben sich möglicherweise Hinweise darauf, auf welchem Weg ein Abbau von PIP₂ zu der Dissoziation von Kanal und NHERF führt und damit auch weitere Hinweise darauf welche Rolle die Phosphorylierung am Threonin in Position 972 in dieser Signalkaskade spielt. Möglicherweise finden sich in diesen Untersuchungen weitere Interaktionen, die für die Regulation des TRPC5 eine Rolle spielen.

4.2. Charakterisierung der HT22-Zellen

4.2.1. Elektrophysiologische Untersuchungen an HT22-Zellen

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung und Identifizierung eines möglichen Kationenkanals in HT22-Zellen. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie Neuronen des Hippokampus der Maus entstammt, einer Gehirnregion, die für ihre prominente TRPC5-Expression bekannt ist (Tai et al. 2011). Eine Überprüfung der mRNA-Expression verschiedener Ionenkanäle mittels qRT-PCR durch unsere Arbeitsgruppe ergab eine hohe Expression von mRNA des TRPC5 während mRNA für TRPC3, 6 und 7 gar nicht und für TRPC1, 2 und 4, sowie spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (CavN und CavPQ) nur in geringerem Maße nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 1.8.). Das Ziel war ein Zellsystem zu finden, in dem unsere Beobachtung zur OAG-Sensitivität des TRPC5 unter einer Inhibition der PKC an endogen exprimierten Kanälen bestätigt werden konnten.

In den Zellen konnte nach PKC-Inhibition mittels Staurosporin und BIM-I durch OAG ein großer Ionenstrom erzeugt werden, der sich durch die Einmalgabe der Chlorid-Kanal-Blocker NPPB und DIDS hemmen ließ. Unter einer konstanten Blockade der Chlorid-Kanäle mit diesen Substanzen ließ sich schließlich ein Ionenstrom beobachten, der durch DHPG (ein Agonist an metabotropen G_q -koppelnden] Glutamat-Rezeptoren), GTPyS und nach vorheriger Inhibition der PKC auch durch OAG aktivierbar war. Diese spezielle OAG-Sensitivität konnte in über 30 Messungen an verschiedenen Tagen und in unterschiedlichen Chargen der HT22-Zelllinie reproduziert werden. Die Aktivierung dieses Ionenstroms konnte durch eine siRNA gegen den TRPC5 gehemmt und der Zuwachs an Strom durch die Aktivierung im Vergleich zum basalen Strom signifikant verringert werden. SiRNAs gegen die andern TRPCs (außer TRPC2), die in den gleichen Vektor eingebaut waren, wie die siRNA gegen den TRPC5, hatten keinen Effekt. Nur die siRNA gegen TRPC6 konnte den Zuwachs an Strom nach einer Aktivierung minimal senken.

4.2.2. *TRPC5: ein Kandidat für den Kationenstrom in HT22-Zellen*

Nach den Ergebnissen der hier vorgestellten elektrophysiologischen Untersuchungen an den HT22-Zellen ist anzunehmen, dass der TRPC5 für den Ionenstrom verantwortlich ist oder ihn zumindest beeinflusst. Der untersuchte Strom ist wie der TRPC5 über G_q -koppelnde Rezeptoren und GTPyS aktivierbar. Zudem zeigt er die in dieser Arbeit untersuchte, sehr spezielle Eigenschaft des TRPC5, dass er erst für OAG sensibel wird, wenn zuvor die PKC gehemmt ist. Nur der TRPC4 teilt diese Eigenschaft mit ihm.

An einem einzigen Untersuchungstag konnte der Ionenstrom auch ohne vorherige PKC-Hemmung durch OAG aktiviert werden. Zusammen mit der Beobachtung,

dass die siRNA gegen den TRPC6 einen minimalen Effekt auf den Ionenstrom zeigte, könnte man argumentieren, dass hinter der OAG-Sensitivität der TRPC6, welcher für seine Aktivierbarkeit durch OAG bekannt ist (Hofmann et al. 1999), steht. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch im Anschluss an diese Arbeit noch mehrfach den Ionenstrom mit OAG alleine nicht aktivieren, während eine vorherige PKC-Inhibition den Kanal wieder für OAG sensitiv machte. Zudem war der Effekt der siRNA gegen TRPC5 wesentlich deutlicher und die siRNA zeigte keinen Effekt auf heterolog exprimierten murinen TRPC6 (vgl. Kapitel 3.5.1.). Auch konnte die mRNA des TRPC6 in HT22-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zeigte die Strom-Spannungsbeziehung (I-V) des Ionenstroms in den HT22-Zellen markante Eigenschaften, die von der I-V des TRPC5 aus heterologen Expressionsmodellen bekannt sind (vgl. Abb. 3.7 A auf Seite 61 und 3.14 A auf Seite 71). V.a. in der Auswärtsrichtung der Strom-Spannungsbeziehung zeigte sich der für den TRPC5 typische Knick mit einem anschließenden Sattel. Auch das Umkehrpotential zwischen 0 und -5 mV ähnelt dem des TRPC5. Bei negativeren Stromwerten fehlt die für den TRPC5 typische Abflachung der Kurve. Es findet sich in manchen Fällen ein leicht angedeuteter Knick zwischen -25 und -50 mV - danach kommt es weiterhin zu einem starken Strom an Ionen, was für ein Homotetramer aus TRPC5-Untereinheiten untypisch ist. Dies könnte auf die Beteiligung weiterer Kanäle am Ionenstrom hindeuten. Bei Werten zwischen -50 und -100 mV findet sich in den meisten Messungen hingegen wieder ein für den TRPC5 typisches Rauschen. Prinzipiell ist aufgrund dieser Unterschiede in der I-V jedoch nicht ausgeschlossen, dass der hier beschriebene Ionenstrom durch ein TRPC5-Homomer stattfindet, da sich die biophysikalischen Eigenschaften eines einzelnen Ionenkanals in verschiedenen Zellmodellen unterscheiden können, was

Freichel (2014) in seinem Übersichtsartikel zum TRPC4 und dessen I-V ausführlich erläutert hat.

Da der nahe Verwandte des TRPC5, der TRPC4 die hier geschilderten Eigenschaften (Aktivierung und I-V) des HT22-Ionenstroms in einem ähnlichen Maße wie der TRPC5 teilt, ist er als möglicher Kandidat mit diesen Daten nur schwer auszuschließen. Die eingesetzte siRNA gegen den TRPC4 war spezifisch für die humane Variante des Kanals und kann die Unterdrückung der murinen Sequenz nicht garantieren. Die siRNA gegen den TRPC5 könnte fälschlicherweise auch die mRNA des TRPC4 unterdrückt haben. Da siRNAs jedoch sehr spezifisch arbeiten und auch die Level der mRNA-Expression im Verhältnis 1000:1 (TRPC5:TRPC4) stand (vgl. Kapitel 1.8.), ist anzunehmen, dass der beschriebene Ionenstrom in den HT22-Zellen auf den TRPC5 zurückzuführen ist. Sollte dies jedoch ein Irrtum sein, so sind die Ergebnisse für einen endogenen TRPC4-Strom ebenso eine Bestätigung der hier vorgestellten Theorie, wie im Falle des TRPC5.

4.2.3. *Testung von α TRPC5 in HEK-293-Zellen mit TRPC3, 5 und 6*

Da die siRNA gegen TRPC5 neu kloniert worden war, sollte ihr Effekt in einem ähnlichen Versuchsaufbau getestet werden. Muriner TRPC5 und ein Rezeptor (rM_5R) wurden mit und ohne siRNA in HEK-293-Zellen transfiziert, um zu sehen, ob die siRNA zu einer Abschwächung des Ionenstroms führen konnte. Es zeigte sich, dass sie eine signifikante Aktivierung durch CCh nicht verhinderte, wobei die typische I-V des TRPC5 zur Darstellung kam. Die gleichen Beobachtungen wurden auch für murinen TRPC3 und 6 gemacht. Dies zeigt, dass die siRNA keinen Effekt auf den G-Protein gekoppelten Aktivierungsweg hatte und die biophysikalischen Eigenschaften der Kanäle nicht verändert wurden. Bei einer weiterführenden Betrachtung der Ergebnisse stellte sich jedoch heraus, dass die Zunahme des

Kationenstroms durch den TRPC5 in Zellen, die mit der siRNA transfiziert waren, deutlich (aber nicht signifikant) geringer ausfiel als in den Kontrollzellen. Dies war für TRPC3 und 6 nicht der Fall. Diese Beobachtung zeigt, dass die Anzahl der eingebauten Ionenkanäle im Falle des TRPC5 durch die siRNA verringert werden konnte, während sie auf die beiden anderen Kanäle keinen Effekt hatte.

Die Wirksamkeit der siRNA gegen den TRPC5 tritt noch deutlicher hervor, wenn man die Einzelwerte der Stromzunahmen jeder Messung in einen Graphen aufträgt. Zwei Messergebnisse fallen dabei besonders auf (Abb. 4.2 A). Im Ausreißer-Test nach Grubbs sind diese Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von >95% und >99% als signifikante Ausreißer zu betrachten (Berechnung vgl. Anhang 5.5.). Nimmt man diese Werte aus dem Vergleich heraus, so wird der Effekt der siRNA auf den murinen TRPC5 noch deutlicher (Abb. 4.2 B). Im Auswärtsstrom wird dieser Effekt im unabhängigen t-Test signifikant (p-Wert <0,05), in Einwärtsstromrichtung nicht (p-Wert 0,18).

Es wurde weiterhin überprüft, ob auch bei der Testung von TRPC3 und 6 mit aTRPC5 Ausreißer vorlagen. Dies war nicht der Fall. Auch ein Weglassen der beiden extremsten Werte dieser Messreihen ergab keine Änderung des Bildes (Daten hier nicht gezeigt). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass aTRPC5 die mRNA des murinen TRPC5 hemmt, gleichzeitig aber keinen Effekt auf TRPC3 und 6 hat.

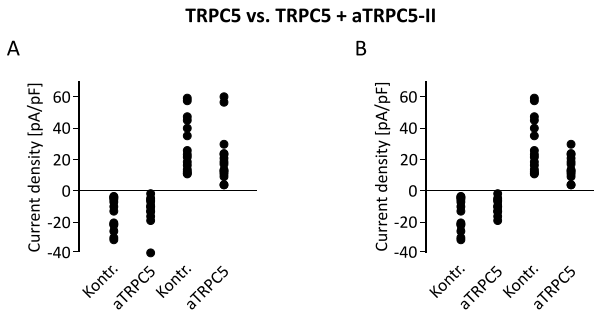


Abbildung 4.2 Vergleich der Stromdichte-Zunahme von TRPC5 mit und ohne aTRPC5

Stromdichte-Zunahmen aus Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen in HEK293-Zellen, transfiziert mit TRPC5 + rM₅R + EGFP (Kontrollzellen) und TRPC5 + rM₅R + aTRPC5 (Testzellen). Aufgetragen sind die Einzelwerte der Stromdichte Zunahme, die sich aus der Differenz der basalen Stromdichte und der nach Aktivierung durch CCh ergibt. Einzelheiten siehe Text.

Dass der hier dargestellte Effekt der aTRPC5 nicht deutlicher ist, liegt wahrscheinlich am gewählten Testverfahren. Da der Kanal mit doppelter Plasmid-Menge im Vergleich zur siRNA transfiziert wurde, konnte die siRNA vermutlich keinen signifikanten Effekt erzielen. Selbst an einem einzelnen Messtag kann es unter Umständen in diesen Modellen zu großen Variabilitäten in der Stromantwort kommen, welche selbst mit Bezug auf die Größe der Zelle in Form der Stromdichte immer noch sehr unterschiedliche Messergebnisse ergeben. Dies macht es unter Umständen schwer, im Patch-Clamp Verfahren signifikante Ergebnisse zu erzielen. Der Versuch, durch die Fluoreszenzmarkierung eine Expression des Kanals in der untersuchten Zelle sicherzustellen, ist ebenfalls kein sicheres Verfahren, da der Kanal zwar in der Zelle exprimiert sein kann, aber nicht unbedingt in die Zellmembran eingebaut sein muss.

Die Unterdrückung der Translation des murinen TRPC5 lässt sich mit den hier vorgestellten elektrophysiologischen Daten zudem nicht quantifizieren. In Gn11-Zellen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die siRNA aTRPC5 bei einer stabilen Transfektion die murine TRPC5-mRNA-Expression um $76,6 \pm 7,7\%$ im Vergleich zum Wild-Typ und um $89,7 \pm 3,4\%$ im Vergleich zu Gn11-Zellen, die für eine unspezifische siRNA kodierten, reduziert. Die mRNA-Level von TRPC1, 2 und 6 blieben dabei unverändert. Zusätzlich konnte in Gn11-Zellen ein CCh-induzierter Strom durch das Heteromer aus TRPC1 und 5 durch aTRPC5 unterdrückt werden (Storch et al. 2012).

4.2.4. *Bewertung der Ergebnisse und Ausblick*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in HT22-Zellen ein Ionenstrom unter Beteiligung des TRPC5 untersucht werden kann. Durch den Einsatz von zwei Chlorid-Kanal-Blockern ist es wahrscheinlich, dass in dieser Arbeit ein Kationenstrom untersucht werden konnte. Um dies zu beweisen, können weitere elektrophysiologische Untersuchungen unter der Verwendung von NMDG als Na^+ -Ersatz in der Badlösung erfolgen.

Die siRNA aTRPC5 könnte zudem weiter charakterisiert werden. Bisher erfolgte die funktionale Untersuchung in verschiedenen Zellmodellen (in heterologer und endogener Expression) mittels Patch-Clamp-Untersuchungen und die Quantifizierung des Effekts auf mRNA-Ebene. Dieser Effekt könnte auch auf Protein-Ebene mittels Western-Blot untersucht werden, wobei es sich bisher als sehr schwierig erwies, einen spezifischen Antikörper gegen TRPC5 herzustellen.

Der Einsatz einer siRNA gegen den murinen TRPC4 könnte noch einmal bestätigen, dass es sich bei dem beobachteten Kanal nicht um den engen Verwandten des TRPC5 handelt.

Es ist sicherlich sinnvoll diese weiteren Experimente durchzuführen, um eine größere Gewissheit zu erlangen. Dennoch können in dieser Arbeit gute Indizien dafür vorgestellt werden, dass sich im HT22-Zellmodell ein Ionenstrom durch einen endogen exprimierten TRPC5 untersuchen lässt. Dieser wird ebenso wie im heterologen Expressionsmodell durch eine Inhibition der PKC für OAG sensibel, was ein deutlicher Hinweis dafür ist, dass der in Kapitel 4.1.5. dargestellte rezeptorgesteuerte Aktivierungsweg über DAG im Falle des TRPC5 eine physiologische Relevanz besitzt.

Letztendlich ist jedoch auch die HT22-Zelllinie, wie jede kultivierbare Zelllinie, nur eine Vereinfachung der Komplexität, die in natürlichen Zellverbänden herrscht. Zum Beispiel fehlen ihr spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (vgl. Abb. 1.4.). Wie in der Einleitung im Kapitel 1.4. beschrieben wird der TRPC5 vor allem im ZNS exprimiert (Okada et al. 1998, Tai et al. 2011). Patch-Clamp-Untersuchungen an primär kultivierten Neuronen oder frisch präparierten ZNS-Schnitten könnten weitere Einsicht in die physiologische Relevanz des Aktivierungsmechanismus über DAG/OAG bringen. Da Spannungsänderung über die Zellmembran in Neuronen eine besondere Rolle spielen, wären diese Zellverbände auch eine ideale Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und der Aktivierung des TRPC5 zu untersuchen.

5. ANHANG

5.1. Heteromerbildung zwischen TRPC-Kanälen

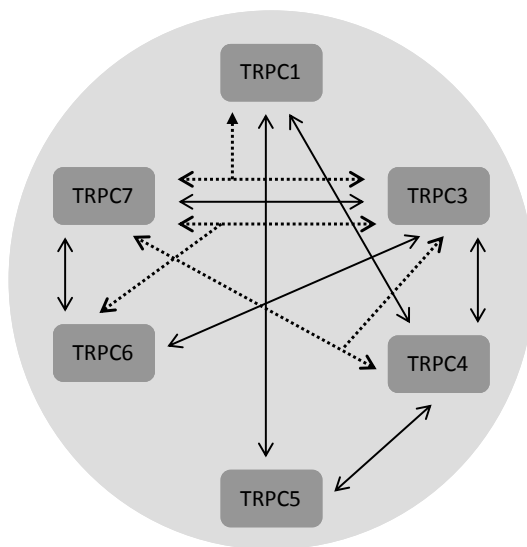


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung der Heteromerbildung zwischen TRPC-Kanälen

Diese Abbildung fasst schematisch zusammen, welche TRPC-Subtypen sich zu Heteromeren zusammenlagern können. Da für den TRPC2 bisher keine Heteromere beschrieben sind, ist er hier nicht berücksichtigt worden. Durchgezogene Pfeile zeigen die Heteromerbildung aus zwei TRPC-Subtypen, gestrichelte Pfeile stehen für Heteromere aus drei Beteiligten. Die Abbildung verdeutlicht, wie Vielfältig die bisher entdeckten Kombinationsmöglichkeiten innerhalb der TRPC-Familie sind und wie viele mögliche physiologische Konsequenzen sich daraus ergeben können. Die Abbildung zeigt nicht die Kombinationsmöglichkeiten von TRPCs mit anderen TRP-Kanälen - z.B. aus TRPC1, 6 und TRPV4 oder TRPC1 mit TRPP2. Adaptiert nach Cheng (2010)

5.2. Tabelle mit Aktivatoren und Inhibitoren der TRPC-Kanäle

TRP	Aktivierung	Inhibition	Quelle (Reviews)
C1	PLC, mechanisch (Dehnung), PI3K, CaM, RTK, erhöhte PKC-Aktivität, NO, store depletion		(Rychkov and Barritt 2007)
C2	DAG, PLC, LPC, <i>store depletion</i> ?		(Yildirim and Birnbaumer 2007)
C3	PIP ₂ , DAG, PLC, Src, IP ₃ , intrazelluläres Ca ²⁺ , AIF,	PKC, Ca ²⁺	(Eder, Poteser, and Groschner 2007)
C4	PIP ₂ -Abbau, PLC, GTPγS, micromolar La ³⁺ , AIF	PKC	(Cavalie 2007)
C5	PIP ₂ -Abbau, PLC, Ca ²⁺ , GTPγS, LPC, ATP, micromolar La ³⁺ /Gd ³⁺ , PIP5K, MLCK, EGF, Protonen, Thioredoxin, AIF, NO, Lipide	PKC, PKA	(Plant and Schaefer 2005) (Beech 2007) (Zholos 2014)
C6	PIP ₂ , DAG, PLC, Src, 20-HETE, Tyrosin-Kinase Fyn, CaM-Kinase II, mechanisch (Dehnung), AIF	PKC, Calm.	(Dietrich and Gudermann 2007)
C7	DAG, PLC, Src, 20-HETE, AIF	PKC	(Numaga, Wakamori, and Mori 2007)

Erstellt nach Rohacs und Nilius (2007) und um genannte Quellen ergänzt.

5.3. Verwendete Materialien und Geräte

In den folgenden Auflistungen finden sich die verwendeten Materialien und Geräte mit einer Bezeichnung der Hersteller.

5.3.1. Verbrauchsmaterialien

Fast alle Laborbedarfsartikel (Zellkulturflaschen, Pipettenspitzen u.a.) wurden von der Firma *Sarstedt* (Nümbrecht) bezogen. Die Ausnahmen sind im Folgenden aufgelistet:

33-mm-Kulturschälchen	<i>Nunc</i> , Langenselbold
Chromatographiesäulen (0,8 x 4 cm)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München
Light Cycler Kapillare	<i>Roche Applied Science</i> , Mannheim
Ultrafiltration-Konzentrierungssäulen (Vivaspin 4ml)	<i>Sartorius</i> , Göttingen

5.3.2. Chemikalien

Die grundlegenden Chemikalien wurden über die Firma *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen) bezogen. Die Ausnahmen sind im Folgenden gelistet:

Agar	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Agarose	<i>Roth</i> , Karlsruhe
BIM-I (Bisindolylmaleimid) I	<i>Calbiochem</i> , Darmstadt
DEAE (Diethylaminoethyl) Cellulose, DE52	<i>Whatman GmbH</i> , Dassel

DHPG ([RS]-3,5-Dihydroxyphenylglycin)	<i>Bio Trend, Köln</i>
DMEM (mit 4,5 g/l Glukose, Sodium Pyruvat und L-Glutamin)	<i>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</i>
DNA-Leiter (100 u. 1000 bp)	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
MEM (minimal essentielles Medium mit Earle's Salzen & L-Glutamin)	<i>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</i>
Ethanol	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
FKS (fetales Kälberserum)	<i>Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Fugene6 [®]	<i>Roche Applied Science, Mannheim</i>
Ham's F-12 (mit L-Glutamin)	<i>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</i>
HCl	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Hefeextrakt	<i>Roth, Karlsruhe</i>
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin- 1-ethansulfonsäure)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Isopropanol	<i>Fisher Scientific, Nidderau</i>
NaCl	<i>Roth, Karlsruhe</i>
OAG (1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol)	<i>Calbiochem, Darmstadt</i>
PBS	<i>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</i>
Penicillin (100 U/ml)	<i>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</i>
Streptomycin (100 µg/ml)	<i>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</i>

Pepton	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Staurosporin	<i>Calbiochem</i> , Darmstadt
TransIT-LT1 (Transfektionsreagenz)	<i>Mirus Bio Corporation</i> , Madison, USA
Trypsin (0,05% mit 0,02% EDTA) in PBS	<i>PAA Laboratories</i> , Pasching, Österreich

5.3.3. Enzyme und Kits

Alle Enzyme, Puffer und Nukleotide für die Standard-PCRs und die Durchführung der RT-PCR (RevertAid. MMuIV) wurden über die Firma *Fermentas* (St. Leon-Rot) bezogen. Die zusätzlichen Bezugsquellen sind im Folgenden gelistet:

Midi-Kit (NucleoBond Xtra Midi)	<i>Macherey-Nagel</i> , Düren
Mini-Kit (peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II)	<i>PEQLAB Biotechnologie</i> , Erlangen
Gelextraktion (peqGOLD Gel Extraction Kit)	<i>PEQLAB Biotechnologie</i> , Erlangen
Mutagenese-Kit (QuickChange II XL, Site-Directed Mutagenesis Kit)	<i>Agilent Technologie</i> , Waldbronn
PepTag [®] Assay für die nicht-radioaktive Messung der Aktivität der PKC	<i>Promega</i> , Madison, USA
Oligos für siRNA-Klonierung	<i>OligoEngine</i> , Seattle, USA
QPCR Syber [®] -Green Capillary Mix	<i>ABgene Advanced Biotechnol. Ltd.</i> , Hamburg

5.3.4. Allgemeine Laborgeräte

Bidest-Anlage (Optipure Analytical)	<i>Membrapure</i> , Bodenheim
Brutschränke:	
Hera Cell 150	<i>Heraeus</i> , Hanau
Hybaid mini oven	<i>MWG-Biotech</i> , Ebersberg
Gelkammer (Agarose-Gelelektrophorese)	<i>Hauseigene Werkstatt</i>
Geldokumentationssystem (Quantum)	<i>PeqLab</i> , Erlangen
Laborwaage	<i>Kern</i> , Balingen
Laborwaage, Feinwaage (AE2000)	<i>Mettler</i> , Gießen
Light Cycler	<i>Roche Applied Science</i> , Mannheim
Magnetrührer (Mr Hei-Standard)	<i>Heidolph</i> , Schwabach
Mikroskop Axiovert 25 (Zellkultur)	<i>Carl Zeiss</i> , Oberkochen
Osmometer Vapro 5520	<i>Wescor</i> , Logan, USA
PCR-Maschine siRNA (grau)	<i>Perkin-Elmer</i>
Photometer Bio	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
pH-Meter inoLab	<i>WTW</i> , Weilheim
Pipetten (alle Größen) Pipetman	<i>Gilson</i> , ;Middleton, USA
Pipetten (2 µl) Peqpette	<i>PEQLAB Biotechnologie</i> , Erlangen
Pipetus Akku	<i>Hirschmann Laborgeräte</i> , Eberstadt
Spannungsquelle für Agarosegelelektrophorese (PowerPac 1000)	<i>BioRad</i> , München
Sterilbänke:	
Biohit, Typ 48	<i>Antares</i> , Köln
Hera Safe	<i>Heraeus</i> , Hanau
Thermoschüttler Orbital Shaker	<i>Forma Scientifics</i> , Frankfurt a.M.

Vortex Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, USA</i>
Wasserbäder DC 10	<i>Haake, Bielefeld</i>
Zentrifugen Biofuge pico; Labofuge 400R	<i>Heraeus, Hanau</i>

5.3.5. *Allgemeine Software-Programme*

Coral DRAW Graphics Suite 12	<i>Corel, Ottawa, USA</i>
Office 2003 (Excel, Word)	<i>Microsoft, Redmond, USA</i>

5.3.6. *Bestandteile des Patch-Clamp-Standes und Bedienungssoftware*

Alle Bauteile, die in dieser Auflistung nicht erwähnt werden (z.B. Faraday'scher Käfig, Messkammer-Einsatz, Absaugpumpe) wurden von der Feinmechanikwerkstatt des Instituts hergestellt.

Analog/Digitalkarte PCI-16	<i>National Instruments, München</i>
Borosilikatglasröhrchen GB150-TF8P	<i>Science Products GmbH, Hofheim</i>
Fluoreszenzmikroskop IX70	<i>Olympus, Hamburg</i>
Fluoreszenzfilter für EGFP - Kenngrößen:	<i>Olympus Niba, Hamburg</i>
Exzitationsfilter: 470-490 nm	
dichroischer Spiegel: 505 nm	
Emissionsfilter: 510-550 nm	
Fluoreszenzlampe (U-RFL-T)	<i>Olympus, Hamburg</i>
Kamera (1/2" Monochrom CCD-Kamera)	<i>EHD, Damme</i>
Mikromanipulator (LN min/combi)	<i>Luigs & Neumann, Ratingen</i>
Monitor	<i>CDM 1203, Monacor</i>

Perfusorspritzen (50 ml)	<i>Braun, Melsungen</i>
Puller (DMZ-Universal-Puller)	<i>Zeitz, München</i>
Referenzelektrode EP05	<i>WPI, Sarasota, USA</i>
Schwingungsgedämpfter Tisch	<i>PI (Physik Instrumente), Waldborn</i>
Silikonschläuche	<i>Braun, Melsungen</i>
Verstärker: EPC 10 (Version E LIH 1600)	<i>HEKA Electronics, Lambrecht</i>

Als Computer-Software für die Patch-Clamp-Messungen wurde Pulse v8.63 (*HEKA Electronics, Lambrecht*) verwendet. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms Origin 6.1 (*OriginLab Corporation, Northampton, USA*).

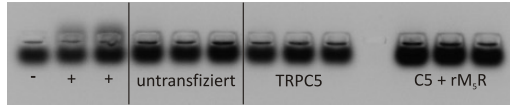
5.4. Bestimmung der PKC-Aktivität

Um der Frage nachzugehen, ob die Koexpression eines Rezeptors (z.B. des rM₅R) zusammen mit TRPC5 in HEK293-Zellen zu einer Verringerung der PKC-Aktivität und vielleicht dadurch zu einer DAG-Aktivierbarkeit des Kanals führt, sollte der PepTag[®] Assay der Firma Promega etabliert werden. In diesem Assay werden Peptide, die hochspezifisch für die Phosphorylierung durch die PKC sind, in eine phosphorylierte und unphosphorylierte Fraktion aufgetrennt. Über ein angehängtes Farbstoffmolekül können die Konzentrationen der beiden Fraktionen bestimmt werden. Über die Konzentrationsunterschiede lässt sich indirekt die Aktivität der PKC in verschiedenen Zellpopulationen vergleichen (vgl. Kapitel 2.4.7.).

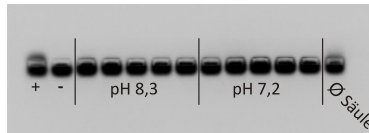
Leider konnte der Assay nach den Angaben des Herstellers mit dem verwendeten HEK293-Zellmodell nicht etabliert werden. Auch ein wiederholtes Ansetzen der Lösungen und die Durchführung durch verschiedene Personen brachte keine Ergebnisse. Es wurde dann versucht, den Assay zu variieren. Zunächst wurden kleinere Änderungen vorgenommen. Z.B. wurden die Zellen nach dem Ablösen nicht mit dem Ultraschallstab behandelt oder die Inkubationszeiten der PKC-Reaktion verändert – alles ohne Erfolg. Ein Problem waren unter anderem die Zellulose-Säulen, über die die lysierten Zellen aufgereinigt werden sollten. Durch den Bradford-Nachweis zeigte sich, dass in ungefähr der Hälfte der Fälle die Proteine sich aus den Säulen gar nicht lösen ließen, was sich auch bei einer fraktionierten Elution bestätigte. Nach den Herstellerangaben sollten die Lösungen unter Raumtemperatur angesetzt werden, das Eluieren der Proteine aus den Säulen aber bei 0-4°C erfolgen. Dies hatte zur Folge, dass der pH des

Elutionspuffers vom ursprünglich eingestellten pH 7,4 auf 8,3-8,5 während der Versuchsdurchführung verändert wurde. Eine Korrektur des pHs ergab leider auch kein Ergebnis (vgl. Abb. 5.2). Das Weglassen der Säulen ergab eine leichte Bande an phosphoryliertem Peptid in der Gelaufentrennung. Es wurde versucht, durch ein fraktioniertes Zentrifugieren den Ansatz aufzureinigen, was allerdings nur zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen führte. In einem weiteren Versuch wurde das Eluat nach dem Einsatz der im Protokoll vorgesehenen Zellulose-Säule durch Ultrafiltration (Vivaspin 4ml, *Sartorius, Göttingen*) auf verschiedene Volumina ankonzentriert. Dies führte wiederum zu einer Änderung des pHs, welche in verschiedenen Ansätzen korrigiert wurde. Leider führte auch diese Versuchsanordnung nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen. Auch der Einsatz eines anderen Zellsystems (CHO-K1-Zellen), das variieren der eingesetzten Zellmenge (0,5-3 Millionen Zellen) oder die Zugabe von Protease-Inhibitoren führte zu keinem reproduzierbaren Ergebnis.

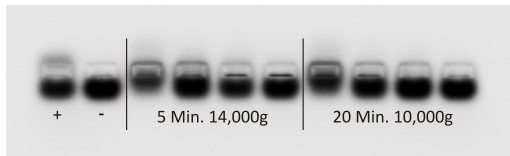
A HEK293



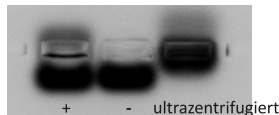
B HEK293 untransfiziert



C HEK293 untransfiziert



D HEK293 untransfiziert

**Abbildung 5.2 Exemplarische Photographien der Befunde aus dem PKC-Assay nach Gelelektrophorese**

Die Positivkontrolle (+) wurde mit aufgereinigter PKC der Ratte, die Negativkontrolle (-) mit ddH₂O durchgeführt. **A** Aufarbeitung von 3 Schalen HEK293-Zellen (je eine: untransfiziert, nur mit TRPC5 bzw. mit TRPC5 und rM₅R transfiziert). Das Eluat aus den Zellulose-Säulen wurde in 3 Fraktionen (von links nach rechts: 1,5 – 1,5 – 2 ml) aufgefangen und entsprechend dem Protokoll weiterverarbeitet. **B** Aufarbeitung von 3 Schalen untransfizierter HEK293-Zellen. Die Zellen der ersten Schale wurde mit einem Puffer bei pH 8,3 aus der Zellulose-Säule eluiert, im zweiten Fall bei pH 7,2, die lysierten Zellen der dritten Schale wurden gar nicht über eine Säule gereinigt. Die beiden Eluate aus den Säulen wurden in Fraktionen von je 1ml aufgefangen und dem Protokoll entsprechend weiterverarbeitet. **C**

Aufarbeitung von 2 Schalen untransfizierter HEK293-Zellen. Es wurde keine Zellulose-Säule verwendet, sondern versucht die 0,5 ml Ansätze durch Zentrifugieren aufzureinigen (links: 5 Minuten mit 14,000g, rechts 20 Min 10,000g bei 4°C) und in Verdünnungen von 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 (von links nach rechts) dem Protokoll entsprechend weiterverarbeitet. **D** Nach dem Schritt der Eluation der Proteine aus der Zellulose-Säule wurden die 5 ml Eluat in diesem Fall auf 500 µl ankonzentriert und entsprechend dem Protokoll weiterverarbeitet.

5.5. Ausreißer-Test nach Grubbs

Berechnung der Differenz zwischen Prüfmerkmalergebnis und Mittelwert:

$$D = X - \text{Mittelwert}$$

Auswärtsstrom [pA/pF]		Einwärtsstrom [pA/pF]	
X	D	X	D
13,69241	-6,03759	-4,31961	5,92039
13,37257	-6,35743	-7,86246	2,37754
21,71799	1,98799	-8,61187	1,62813
20,80817	1,07817	-7,90003	2,33997
17,04184	-2,68816	-16,18595	-5,94595
12,6758	-7,0542	-9,32237	0,91763
23,79327	4,06327	-13,25597	-3,01597
3,88161	-15,84839	-1,19438	9,04562
29,72933	9,99933	-11,05696	-0,81696
9,06372	-10,66628	-4,94934	5,29066
11,25066	-8,47934	-6,58679	3,65321
18,57077	-1,15923	-18,87735	-8,63735
10,78794	-8,94206	-4,71269	5,52731
23,17857	3,44857	-9,76055	0,47945
56,50856	36,77856	-39,44929	-29,20929
3,91416	-15,81584	-1,73789	8,50211
59,96381	40,23381	-12,74646	-2,50646
11,97694	-7,75306	-10,23316	0,00684

12,88177	-6,84823	-5,82612	4,41388
Mittelwert	19,73	Mittelwert	-10,24
SD	15,12	SD	8,41

Tabelle der p-Werte zum Ausreißertest nach Grubbs bei $n = 19$

P - 90%: 2,361

P - 95%: 2,532

P - 99%: 2,854

Berechnung der Prüfgröße für den Auswärtsstrom:

$PG = \text{abs}(d_{\text{max}} / sd)$

$PG (\text{Auswärtsstrom}): 40,32/15,12 = 2,661$

Vergleich mit Tabellenwert ($n=19$ für 95%): $2,661 > 2,532$

Die Prüfgröße ist größer als der Tabellenwert, also ist der Wert zu >95% ein signifikanter Ausreißer.

Berechnung der Prüfgröße für den Einwärtsstrom:

$PG = \text{abs}(d_{\text{max}} / sd)$

$PG (\text{Auswärtsstrom}): -29,21/8,41 = 3,47$

Vergleich mit Tabellenwert ($n=19$ für 99%): $3,47 > 2,854$

Die Prüfgröße ist größer als der Tabellenwert, also ist der Wert zu >99% ein signifikanter Ausreißer.

QUELLENVERZEICHNIS

- Abramowitz, J., and L. Birnbaumer. 2009. "Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels." *FASEB J*, 297-328.
- Aktories, Klaus. 2005. *Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. Auflage. Elsevier, München.
- Alberts, Bruce, Dennis Bray, and Karin Hopkin, eds. 2012. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Vol. 4. Auflage: Wiley-VCH.
- Beech, D. J. 2007. "Canonical transient receptor potential 5." *Handb Exp Pharmacol* 179:109-23.
- Berg, A. P., N. Sen, and D. A. Bayliss. 2007. "TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons." *J Neurosci* 27 33:8845-56.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and H. L. Roderick. 2003. "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 517-29. England.
- Berridge, M.J. 1995. "Capacitative calcium entry." *Biochemical Journal* 312:1-11.
- Bezerides, V. J., I. S. Ramsey, S. Kotecha, A. Greka, and D. E. Clapham. 2004. "Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels." *Nat Cell Biol* 6:702-720.
- Blair, NT, JS Kaczmarek, and DE Clapham. 2009. "Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels." *J Gen Physiol* 133 5:525-46.
- Boguslawska, D. M., B. Machnicka, A. Hryniewicz-Jankowska, and A. Czogalla. 2014. "Spectrin and phospholipids - the current picture of their fascinating interplay." *Cell Mol Biol Lett* 19 1:158-79
- Boulay, G., D. M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M. X. Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba, and L. Birnbaumer. 1999. "Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry." *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Boulay, G., X. Zhu, M. Peyton, M. Jiang, R. Hurst, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1997. "Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry

- secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein." *J Biol Chem*
- Bousquet, S. M., M. Monet, and G. Boulay. 2010. "Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition." *In J Biol Chem*, 40534-43.
- Caplen, N. J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R. A. Morgan. 2001. "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 9742-7. United States.
- Cavalie, A. 2007. "Ionic channels formed by TRPC4." *Handb Exp Pharmacol* (179):93-108.
- Cheng, K. T., H. L. Ong, X. Liu, and I. S. Ambudkar. 2013. "Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca²⁺ entry." *Curr Top Membr* 71:149-79.
- Cheng, W., C. Sun, and J. Zheng. 2010. "Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity." *Protein Cell* 1 9:802-10.
- Clapham, D. E. 2003. "TRP channels as cellular sensors." *Nature* 426 6966:517-24.
- Clapham, D. E. 2007. "Calcium signaling." *Cell*, 1047-58. United States.
- Clapham, D. E., D. Julius, C. Montell, and G. Schultz. 2005. "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels." *Pharmacol Rev* 57 4:427-50.
- Cosens, D. J., and A. Manning. 1969. "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant." *Nature* 224 216:285-7.
- Davare, M. A., D. A. Fortin, T. Saneyoshi, S. Nygaard, S. Kaeck, G. Banker, T. R. Soderling, and G. A. Wayman. 2009. "Transient receptor potential canonical 5 channels activate Ca²⁺/calmodulin kinase Iγ to promote axon formation in hippocampal neurons." *J Neurosci*, 9794-808
- Davis, JB, and P Maher. 1994. "Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line." *Brain Res* 652 (1):169-73.
- Dietrich, A., and T. Gudermann. 2007. "TRPC6." *Handb Exp Pharmacol* (179):125-41.
- Eder, P., M. Poteser, and K. Groschner. 2007. "TRPC3: a multifunctional, pore-forming signalling molecule." *Handb Exp Pharmacol* (179):77-92.
- Edwards, F. A., A. Konnerth, B. Sakmann, and T. Takahashi. 1989. "A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system." *Pflugers Arch* 414 5:600-12.

- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature*, 494-8.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. 2002. "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." *Methods*, 199-213. United States: 2002 Elsevier Science.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly, and A. Rao. 2006. "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature*, 179-85.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391 6669:806-11.
- Flemming, P. K., A. M. Dedman, S. Z. Xu, J. Li, F. Zeng, J. Naylor, C. D. Benham, A. N. Bateson, K. Muraki, and D. J. Beech. 2006. "Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel." *J Biol Chem* 281 8:4977-82.
- Flockerzi, V. 2007. "An introduction on TRP channels." *Handb Exp Pharmacol* 179:1-19.
- Flockerzi, V., and B. Nilius. 2014. "TRPs: truly remarkable proteins." *Handb Exp Pharmacol* 222:1-12.
- Freichel, M., V. Tsvilovskyy, and J. E. Camacho-Londono. 2014. "TRPC4- and TRPC4-containing channels." *Handb Exp Pharmacol* 222:85-128.
- Greka, A., B. Navarro, E. Oancea, A. Duggan, and D. E. Clapham. 2003. "TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology." *Nat Neurosci* 6 8:837-45.
- Groschner, K., S. Hingel, B. Lintschinger, M. Balzer, C. Romanin, X. Zhu, and W. Schreibmayer. 1998. "Trp proteins form store-operated channels in human vascular endothelial cells." *FEBS Lett.* 437:101-106.
- Gross, S. A., G. A. Guzman, U. Wissenbach, S. E. Philipp, M. X. Zhu, D. Bruns, and A. Cavalie. 2009. "TRPC5 is a Ca²⁺-activated channel functionally coupled to Ca²⁺-selective ion channels." *J Biol Chem* 284 49:34423-32.
- Haasnoot, J., E. M. Westerhout, and B. Berkhout. 2007. "RNA interference against viruses: strike and counterstrike." *Nat Biotechnol*, 1435-43. United States.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* 391 2:85-100.

- Hardie, R. C., and B. Minke. 1992. "The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors." *Neuron* 8 4:643-51.
- Hardie, R. C., A. Peretz, E. Suss-Toby, A. Rom-Glas, S. A. Bishop, Z. Selinger, and B. Minke. 1993. "Protein kinase C is required for light adaptation in Drosophila photoreceptors." *Nature* 363 6430:634-7.
- Hartmann, J., E. Dragicevic, H. Adelsberger, H. A. Henning, M. Sumser, J. Abramowitz, R. Blum, A. Dietrich, M. Freichel, V. Flockerzi, L. Birnbaumer, and A. Konnerth. 2008. "TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination." *Neuron* 59 3:392-8.
- He, Z., C. Jia, S. Feng, K. Zhou, Y. Tai, X. Bai, and Y. Wang. 2012. "TRPC5 channel is the mediator of neurotrophin-3 in regulating dendritic growth via CaMKIIalpha in rat hippocampal neurons." *J Neurosci*, 9383-95.
- Hofmann, T., A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, and G. Schultz. 1999. "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." *Nature* 397:259-263.
- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz, and T. Gudermann. 2002. "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 11:7461-6.
- Huber, A., P. Sander, M. Bahner, and R. Paulsen. 1998. "The TRP Ca²⁺ channel assembled in a signaling complex by the PDZ domain protein INAD is phosphorylated through the interaction with protein kinase C (ePKC)." In *FEBS Lett*, 317-22. Netherlands.
- Inoue, R., T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito, and Y. Mori. 2001. "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α 1-adrenoceptor-activated Ca²⁺-permeable cation channel." *Circ Res* 88 3:325-32.
- Jung, S., A. Mühle, M. Schaefer, R. Strotmann, G. Schultz, and T. D. Plant. 2003. "Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth." *J Biol Chem* 278 6:3562-71.
- Jung, S., R. Strotmann, G. Schultz, and T. D. Plant. 2002. "TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 282 2:C347-59.
- Kalwa, Hermann. 2009. Die physiologische Funktion von TRPC6 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Lunge. University of Marburg.
- Kanki, H., M. Kinoshita, A. Akaike, M. Satoh, Y. Mori, and S. Kaneko. 2001. "Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for the opening of mouse TRP5 channels." *Mol Pharmacol* 60 5:989-98.

- Keddi, N., T. Szabo, J. D. Lile, J. J. Treanor, Z. Olah, M. J. Iadarola, and P. M. Blumberg. 2001. "Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1." *J Biol Chem* 276 30:28613-9.
- Kepura, F. 2010. Die Rolle von TRPC1 in CA1-Neuronen des murinen Hippocampus. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Khvorova, A., A. Reynolds, and S. D. Jayasena. 2003. "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell*, 209-16. United States.
- Kim, J. Y., and D. Saffen. 2005. "Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels." In *J Biol Chem*, 32035-47.
- Kim, M. T., B. J. Kim, J. H. Lee, S. C. Kwon, D. S. Yeon, D. K. Yang, I. So, and K. W. Kim. 2006. "Involvement of calmodulin and myosin light chain kinase in activation of mTRPC5 expressed in HEK cells." In *Am J Physiol Cell Physiol*, C1031-40.
- Kinoshita-Kawada, M., J. Tang, R. Xiao, S. Kaneko, J. K. Foskett, and M. X. Zhu. 2005. "Inhibition of TRPC5 channels by Ca²⁺-binding protein 1 in *Xenopus* oocytes." *Pflugers Arch* 450 5:345-54.
- Kiselyov, K., G. A. Mignery, M. X. Zhu, and S. Muallem. 1999. "The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels [In Process Citation]." *Mol Cell* 4 3:423-9.
- Kiselyov, K., X. Xu, G. Mozhayeva, T. Kuo, I. Pessah, G. Mignery, X. Zhu, L. Birnbaumer, and S. Muallem. 1998. "Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated channels." *Nature* 396:478-482.
- Kunert-Keil, C., F. Bisping, J. Kruger, and H. Brinkmeier. 2006. "Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains." *BMC Genomics*, 159.
- Lee, Y. M., B. J. Kim, H. J. Kim, D. K. Yang, M. H. Zhu, K. P. Lee, I. So, and K. W. Kim. 2003. "TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284 4:G604-16.
- Lee-Kwon, W., J. B. Wade, Z. Zhang, T. L. Pallone, and E. J. Weinman. 2005. "Expression of TRPC4 channel protein that interacts with NHERF-2 in rat descending vasa recta." *Am J Physiol Cell Physiol* 288 4:C942-9.
- Lemonnier, L., M. Trebak, and J. W. Putney, Jr. 2008. "Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate." *Cell Calcium*, 506-14.
- Li, H. S., X. Z. Xu, and C. Montell. 1999. "Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF." *Neuron*, 261-73.

- Liao, M., E. Cao, D. Julius, and Y. Cheng. 2013. "Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy." *Nature* 504 (7478):107-12.
- Liao, Y., C. Erxleben, J. Abramowitz, V. Flockerzi, M. X. Zhu, D. L. Armstrong, and L. Birnbaumer. 2008. "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." In *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2895-900.
- Liao, Y., N. W. Plummer, M. D. George, J. Abramowitz, M. X. Zhu, and L. Birnbaumer. 2009. "A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry." In *Proc Natl Acad Sci U S A*, 3202-6.
- Lintschinger, B., M. Balzer-Geldsetzer, T. Baskaran, W. F. Graier, C. Romanin, M. X. Zhu, and K. Groschner. 2000. "Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels." *J Biol Chem*, 27799-805.
- Liou, J., M. L. Kim, W. D. Heo, J. T. Jones, J. W. Myers, J. E. Ferrell, Jr., and T. Meyer. 2005. "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." *Curr Biol*, 1235-41. England.
- Liu, X., B. B. Singh, and I. S. Ambudkar. 2003. "TRPC1 is required for functional store-operated Ca²⁺ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region." *J Biol Chem*, 11337-43.
- Liu, X., W. Wang, B. B. Singh, T. Lockwich, J. Jadowiec, B. O'Connell, R. Wellner, M. X. Zhu, and I. S. Ambudkar. 2000. "Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells." *J Biol Chem* 275 5:3403-11.
- Lucas, P., K. Ukhanov, T. Leinders-Zufall, and F. Zufall. 2003. "A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction." *Neuron* 40 (3):551-61.
- Margrie, T. W., A. H. Meyer, A. Caputi, H. Monyer, M. T. Hasan, A. T. Schaefer, W. Denk, and M. Brecht. 2003. "Targeted whole-cell recordings in the mammalian brain in vivo." *Neuron* 39 6:911-8.
- Mery, L., B. Strauss, J. F. Dufour, K. H. Krause, and M. Hoth. 2002. "The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells." *J Cell Sci* 115 Pt 17:3497-508.
- Mio, K., T. Ogura, S. Kiyonaka, Y. Hiroaki, Y. Tanimura, Y. Fujiyoshi, Y. Mori, and C. Sato. 2007. "The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas." *J Mol Biol*, 373-83.

- Montell, C. 1999. "Visual transduction in *Drosophila*." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:231-68.
- Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R. J. Bindels, E. A. Bruford, M. J. Caterina, D. E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A. M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu, and M. X. Zhu. 2002. "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels." *Mol Cell* 9 2:229-31.
- Montell, C., and G. M. Rubin. 1989. "Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." *Neuron* 2 4:1313-23.
- Morimoto, B. H., and D. E. Koshland, Jr. 1990. "Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line." In *Neuron*, 875-80.
- Munsch, T., M. Freichel, V. Flockerzi, and H. C. Pape. 2003. "Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 26:16065-70.
- Müller-Esterl, Werner, ed. 2004. *Biochemie*. Vol. 1. Auflage. München: Elsevier GmbH.
- Neher, E., and B. Sakmann. 1976. "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature* 260 5554:799-802.
- Nilius, B., and V. Flockerzi. 2014. "Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface." *Handb Exp Pharmacol* 223:v - vi.
- Nilius, B., and G. Owsianik. 2010. "Transient receptor potential channelopathies." *Pflugers Arch* 460 2:437-50.
- Nilius, B., and G. Owsianik. 2011. "The transient receptor potential family of ion channels." *Genome Biol*, 218.
- Numaga, T., M. Wakamori, and Y. Mori. 2007. "TRPC7." *Handb Exp Pharmacol* 179:143-51.
- Numberger, M., and A. Draguhn. 1996. *Patch-Clamp-Technik, Labor im Fokus*. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Obukhov, A. G., and M. C. Nowycky. 2004. "TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50)." *J Cell Physiol* 201 (2):227-35.
- Obukhov, A. G., and M. C. Nowycky. 2008. "TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle." *J Cell Physiol* 216 (1):162-71.

- Odell, A. F., D. F. Van Helden, and J. L. Scott. 2008. "The spectrin cytoskeleton influences the surface expression and activation of human transient receptor potential channel 4 channels." *J Biol Chem* 283 (7):4395-407.
- Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto, and Y. Mori. 1999. "Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor." *J Biol Chem* 274 39:27359-70.
- Okada, T., S. Shimizu, M. Wakamori, A. Maeda, T. Kurosaki, N. Takada, K. Imoto, and Y. Mori. 1998. "Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain." *J. Biol. Chem.* 273:10279-10287.
- Ong, H. L., L. B. de Souza, K. T. Cheng, and I. S. Ambudkar. 2014. "Physiological functions and regulation of TRPC channels." *Handb Exp Pharmacol* 223:1005-34.
- Otsuguro, K., J. Tang, Y. Tang, R. Xiao, M. Freichel, V. Tsvilovskyy, S. Ito, V. Flockerzi, M. X. Zhu, and A. V. Zholos. 2008. "Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." In *J Biol Chem*, 10026-36.
- Philipp, S., A. Cavalie, M. Freichel, U. Wissenbach, S. Zimmer, C. Trost, A. Marquart, M. Murakami, and V. Flockerzi. 1996. "A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL." *EMBO J* 15 22:6166-71.
- Philipp, S., J. Hambrecht, L. Braslavski, G. Schroth, M. Freichel, M. Murakami, A. Cavalié, and V. Flockerzi. 1998. "A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells." *EMBO J.* 17:4274-4282.
- Plant, T. D., and M. Schaefer. 2005. "Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371 4:266-76.
- Putney, J. W. 2005. "Physiological mechanisms of TRPC activation." *Pflugers Arch* 451 1:29-34.
- Ren, Haoming. 2007. Untersuchung des Aktivierungsmechanismus von TRPC5. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Rey, O., S. H. Young, R. Papazyan, M. S. Shapiro, and E. Rozengurt. 2006. "Requirement of the TRPC1 cation channel in the generation of transient Ca²⁺ oscillations by the calcium-sensing receptor." *J Biol Chem*, 38730-7.

- Riccio, A., Y. Li, J. Moon, K. S. Kim, K. S. Smith, U. Rudolph, S. Gapon, G. L. Yao, E. Tsvetkov, S. J. Rodig, A. Van't Veer, E. G. Meloni, W. A. Carlezon, Jr., V. Y. Bolshakov, and D. E. Clapham. 2009. "Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior." *Cell*, 761-72.
- Riccio, A., A. D. Medhurst, C. Mattei, R. E. Kelsell, A. R. Calver, A. D. Randall, C. D. Benham, and M. N. Pangalos. 2002. "mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues." *Brain Res Mol Brain Res* 109 1-2:95-104.
- Rohacs, T., and B. Nilius. 2007. "Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides." *Pflugers Arch* 455 1:157-68.
- Roos, J., P. J. DiGregorio, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Liudyno, S. Zhang, O. Safrina, J. A. Kozak, S. L. Wagner, M. D. Cahalan, G. Velicelebi, and K. A. Stauderman. 2005. "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function." *J Cell Biol*, 435-45.
- Rychkov, G., and G. J. Barritt. 2007. "TRPC1 Ca^{2+} -permeable channels in animal cells." *Handb Exp Pharmacol* 179:23-52.
- Saleh, S. N., A. P. Albert, and W. A. Large. 2009. "Obligatory role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in activation of native TRPC1 store-operated channels in vascular myocytes." *J Physiol*, 531-40. England.
- Saleh, S. N., A. P. Albert, C. M. Peppiatt, and W. A. Large. 2006. "Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes." *J Physiol*, 479-95. England.
- Schaefer, M., T. D. Plant, A. G. Obukhov, T. Hofmann, T. Gudermann, and G. Schultz. 2000. "Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5." *J Biol Chem* 275 23:17517-26.
- Schmidt, Robert, Florian Lang, and Manfred Heckmann, eds. 2010. *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. Auflage: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Smith, D. P., R. Ranganathan, R. W. Hardy, J. Marx, T. Tsuchida, and C. S. Zuker. 1991. "Photoreceptor deactivation and retinal degeneration mediated by a photoreceptor-specific protein kinase C." *Science* 254 5037:1478-84.
- Smyth, J. T., L. Lemonnier, G. Vazquez, G. S. Bird, and J. W. Putney, Jr. 2006. "Dissociation of regulated trafficking of TRPC3 channels to the plasma membrane from their activation by phospholipase C." *J Biol Chem*, 11712-20. United States.
- Soboloff, J., M. Spassova, T. Hewavitharana, L. P. He, P. Luncsford, W. Xu, K. Venkatachalam, D. van Rossum, R. L. Patterson, and D. L. Gill. 2007.

- "TRPC channels: integrators of multiple cellular signals." *Handb Exp Pharmacol* 179:575-91.
- Storch, Forst A. L., Pardatscher F., Philipp M., Gregoritz M., Gudermann T., and Mederos y Schnitzler M. 2015, Zur Veröffentlichung eingereicht. NHERF dissociation from TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol.
- Storch, U., A. L. Forst, M. Philipp, T. Gudermann, and M. Mederos y Schnitzler. 2012. "Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes." *J Biol Chem*, 3530-40.
- Strübing, C, G Krapivinsky, L Krapivinsky, and DE Clapham. 2001. "TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain." *Neuron* 29 3:645-55.
- Sung, T. S., J. P. Jeon, B. J. Kim, C. Hong, S. Y. Kim, J. Kim, J. H. Jeon, H. J. Kim, C. K. Suh, S. J. Kim, and I. So. 2011. "Molecular determinants of PKA-dependent inhibition of TRPC5 channel." *Am J Physiol Cell Physiol* 301 4:C823-32.
- Tai, C., D. J. Hines, H. B. Choi, and B. A. MacVicar. 2011. "Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons." *Hippocampus* 21 9:958-67.
- Tang, Y., J. Tang, Z. Chen, C. Trost, V. Flockerzi, M. Li, V. Ramesh, and M. X. Zhu. 2000. "Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF." *J Biol Chem* 275 48:37559-64.
- Tomita, Y., S. Kaneko, M. Funayama, H. Kondo, M. Satoh, and A. Akaike. 1998. "Intracellular Ca²⁺ store-operated influx of Ca²⁺ through TRP-R, a rat homolog of TRP, expressed in *Xenopus* oocytes." *Neurosci. Lett.* 248:195-198.
- Trebak, M., G. S. Bird, R. R. McKay, and J. W. Putney, Jr. 2002. "Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition." *J Biol Chem*, 21617-23.
- Trebak, M., N. Hempel, B. J. Wedel, J. T. Smyth, G. S. Bird, and J. W. Putney, Jr. 2005. "Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712." *Mol Pharmacol*, 558-63.
- Trebak, M., L. Lemonnier, W. I. DeHaven, B. J. Wedel, G. S. Bird, and J. W. Putney, Jr. 2009. "Complex functions of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in regulation of TRPC5 cation channels." *Pflugers Arch* 457 4:757-69.

- Trebak, M., J. Bird G. St, R. R. McKay, L. Birnbaumer, and J. W. Putney, Jr. 2003. "Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels." *J Biol Chem*, 16244-52.
- Vaca, L. 2010. "SOCIC: the store-operated calcium influx complex." In *Cell Calcium*, 199-209. Netherlands: 2010 Elsevier Ltd.
- van Rossum, D. B., and R. L. Patterson. 2009. "PKC and PLA2: probing the complexities of the calcium network." *Cell Calcium*, 535-45. Netherlands.
- Vannier, B., X. Zhu, D. Brown, and L. Birnbaumer. 1998. "The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry." *J. Biol. Chem.* 273:8675-8679.
- Vazquez, G., J. P. Lievremon, J. Bird G. St, and J. W. Putney, Jr. 2001. "Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 20:11777-82.
- Vazquez, G., B. J. Wedel, O. Aziz, M. Trebak, and J. W. Putney, Jr. 2004. "The mammalian TRPC cation channels." In *Biochim Biophys Acta*, 21-36. Netherlands.
- Vazquez, G., B. J. Wedel, B. T. Kawasaki, G. S. Bird, and J. W. Putney, Jr. 2004. "Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels." *J Biol Chem* 279 39:40521-8.
- Vazquez, G., B. J. Wedel, M. Trebak, G. St John Bird, and J. W. Putney, Jr. 2003. "Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation." In *J Biol Chem*, 21649-54. United States.
- Venkatachalam, K., and C. Montell. 2007. "TRP channels." *Annu Rev Biochem* 76:387-417.
- Venkatachalam, K., F. Zheng, and D. L. Gill. 2003. "Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C." *J Biol Chem* 278 31:29031-40.
- Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, D. L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Huberson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner, and J. P. Kinet. 2006. "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry." In *Science*, 1220-3.
- Weinman, E. J., R. A. Hall, P. A. Friedman, L. Y. Liu-Chen, and S. Shenolikar. 2006. "The association of NHERF adaptor proteins with G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases." *Annu Rev Physiol* 68:491-505.

- Wes, P. D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, and C. Montell. 1995. "TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 21:9652-6.
- Whitehead, K. A., R. Langer, and D. G. Anderson. 2009. "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery." In *Nat Rev Drug Discov*, 129-38. England.
- Wikipedia-1. "<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Patchmodes-de.svg>." 2013/03/ 14 14:50.
- Wikipedia-2. "<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Patchclamp.svg>." 2013/03/14 14:55.
- Yamada, H., M. Wakamori, Y. Hara, Y. Takahashi, K. Konishi, K. Imoto, and Y. Mori. 2000. "Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells." *Neurosci Lett* 285 2:111-4.
- Yan, Hai-Dun, Claudio Villalobos, and Rodrigo Andrade. 2009. "TRPC Channels Mediate a Muscarinic Receptor-Induced Afterdepolarization in Cerebral Cortex." *J. Neurosci.* 29 32:10038-10046.
- Yildirim, E., and L. Birnbaumer. 2007. "TRPC2: molecular biology and functional importance." *Handb Exp Pharmacol* (179):53-75.
- Zeng, F., S. Z. Xu, P. K. Jackson, D. McHugh, B. Kumar, S. J. Fountain, and D. J. Beech. 2004. "Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell." *Journal of Physiology* 559 Pt 3:739-50.
- Zhang, L., and D. Saffen. 2001. "Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization." *J Biol Chem* 276 16:13331-9.
- Zhang, Z., J. Tang, S. Tikunova, J. D. Johnson, Z. Chen, N. Qin, A. Dietrich, E. Stefani, L. Birnbaumer, and M. X. Zhu. 2001. "Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 6:3168-73.
- Zholos, A. V. 2014. "TRPC5." *Handb Exp Pharmacol* 222:129-56.
- Zhu, M. H., M. Chae, H. J. Kim, Y. M. Lee, M. J. Kim, N. G. Jin, D. K. Yang, I. So, and K. W. Kim. 2005. "Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C." *Am J Physiol Cell Physiol*, C591-600. United States.
- Zhu, X, M Jiang, M Peyton, G Boulay, R Hurst, E Stefani, and L Birnbaumer. 1996. "trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry." *Cell* 85 5:661-71.

-
- Zhu, X., M. Jiang, and L. Birnbaumer. 1998. "Receptor-activated Ca^{2+} influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells." *J. Biol. Chem.* 273:133-142.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Gutenberg-Universität Mainz (vorklinischer Teil des Studiums)

Bickes-Kelleher	Konerding
Luhmann	Moosmann
Müller	Müller-Klieser
Pietrzik	Schulte
Spessert	

Philipps-Universität Marburg (klinischer Teil des Studiums)

Bartsch	Moll
Baum	Neubauer
Becker	Nimsky
Czubayko	Oertel
Donner-Banzhoff	Plant
Fuchs-Winkelmann	Ruchholtz
Gress	Schäfer
Hofmann	Sekundo
Kann	Vogelmeier
Klose	Wagner
König	Wulf
Lohoff	

Danksagung

Wie jede Arbeit dieser Art ist auch diese nicht allein mein Verdienst. Vor allem als Mediziner braucht man immer jemanden, der einen bei der Hand nimmt - einem die Dinge zeigt und erklärt. Und vor allem einem hilft, das auf Fakten getrimmte Denken zu erweitern, zu hinterfragen und zu vertiefen. Die Personen, die diese Aufgabe in meinem Fall übernommen haben und bei denen ich mich herzlich dafür bedanken möchte, sind:

Prof. Timothy Plant, der - obwohl er keinerlei Gewinn aus meiner Anwesenheit im Labor hatte - zu jederzeit mit einem offenen Ohr für mich da war. Er hat nie darin nachgelassen mir alle Dinge wirklich erklären zu wollen und konnte mir mit seinen knappen Fragen immer wieder zeigen, dass die meisten Sachverhalte viel komplexer sind, als sie in Büchern, Artikeln oder in Gesprächen auf dem Laborflur dargestellt werden. Und obwohl wir so grundlegend verschieden sind, hat ihn sein angenehmer britischer Humor zu einem meiner beiden liebsten Mensa-Partner werden lassen. Und das will etwas heißen!

Eva Braun, die der Grund war, warum man auch an Tagen, an denen kein Versuch anstand, einfach mal auf einen Plausch ins Labor kam. Und die es schaffte, einen anstrengenden "Pipetier"-Marathon zu einem lustigen, unterhaltsamen und nie langweiligen Zeitvertreib zu machen.

Prof. Michael Mederos y Schnitzler und Prof. Thomas Gudermann, die mir das Vertrauen geschenkt und mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben. Sie

haben mir freundlicherweise das Thema überlassen, sowie die Betreuung und Anleitung übernommen.

Dr. Ursula Storch, welche die ersten Versuche für dieses Projekt durchgeführt und mich dann mit offenen Armen willkommen geheißen hat. Auch wenn wir letztendlich kein Start-up gegründet haben und jeder noch auf dem Weg ist, den er damals eingeschlagen hat, war es doch immer wieder lustig, von verschiedenen Möglichkeiten zu träumen, "einfach" an Geld zu kommen.

Dr. Ulrike Weirauch möchte ich für die Unterstützung bei dem Versuch, den PKC-Assay zu etablieren, danken. Zudem war sie, nachdem sich der Patch-Raum zunehmend Richtung München geleert hatte, eine unterhaltsame Anlaufstelle für Gespräche aller Art, eine hervorragende Köchin und hat meine Frau und mich auf den Namen für unsere Tochter gebracht. Dadurch werden wir sie wohl nie vergessen.

Dr. Hermann Kalwa danke ich für die Einführung in die Welt der siRNA und die Überlassung der siRNAs gegen die meisten TRPCs.

Prof. Carsten Culmsee danke ich für das komplikationslose Überlassen der HT22-Zellen.

Frau Marga Losekam danke ich für die Unterstützung bei dem Versuch, den PKC-Assay zu etablieren.

Mit Rat und Tat zur Seite standen mir zudem: Prof. Achim Aigner, Prof. Frank Czubayko, Prof. Alexander Dietrich, Tanja Pfeffer-Eckel, Meike Fahlbusch, Dr. Thomas Hofmann, Silke Kaske, Dr. Frauke Kepura, Michael Koch, Tim Mayer.

Ihnen und den Personen, die ich vielleicht vergessen habe, möchte ich sehr herzlich danken!

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Großmutter, meinen Eltern und Hanna. Ohne sie wäre all das nicht möglich gewesen.